

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Interacción de la IgM humana con la proteína A de
Staphylococcus Aureus : bases estructurales de la
reactividad alternativa de inmunoglobulinas con proteína A**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Miguel Ángel Vidal Caballero

DIRECTOR:

F. P. Conde

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5311945877

INTERACCION DE LA IgM HUMANA CON LA PROTEINA A DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS, BASES ESTRUCTURALES DE LA REACTIVIDAD
ALTERNATIVA DE INMUNOGLOBULINAS CON PROTEINA A.

Tesis que para optar al Grado de
Doctor en Biología por la Univer-
sidad Complutense presenta
Miguel Angel Vidal Caballero.
Departamento de Investigación,
Centro Ramón y Cajal, Madrid.
Marzo de 1984.

V^oB^o, el Director

Dr. F.P. Conde

V^oB^o, el Ponente

Dr. A.M. Municio

M.A. Vidal



R. 28.487

Este trabajo se ha efectuado en los laboratorios del Departamento de Investigación del Centro Ramón y Cajal del INSALUD en Madrid.

Al Jefe de Sección del mismo, Dr. F.P.Conde, director de esta tesis, agradezco esa labor, así como la disposición de los medios que han hecho posible su realización.

Agradezco también al Prof. Dr. J.M.R. Delgado, Jefe del Departamento, el haberme permitido desarrollar este trabajo en el mismo.

Al Dr. E. Méndez, del Servicio de Endocrinología del Centro Ramón y Cajal debo su ayuda en algunas técnicas, y al Dr. F. Sánchez-Madrid, de la División de Investigación de Alergia e Inmunología Abelló. S.A., la cesión de reactivos y la discusión de algunos resultados.

Hay que señalar la colaboración de otros Servicios del Centro Ramón y Cajal (Medicina Interna, Endocrinología, Hematología, etc.) en la provisión de materiales y la utilización de instrumental de sus instalaciones.

Agradezco al Prof. Dr. A. Martín Municio, Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, sus comentarios y la amabilidad de encargarse de la ponencia de esta tesis.

El apoyo de Carmela Calés trasciende su asistencia en la redacción de esta tesis por la que aquí figura.

INDICE

I. INTRODUCCION.

Página

I.1. Presentación del trabajo.	1
I.2. Bacterias con receptores para proteínas de suero.	3
I.2.1. Receptores de inmunoglobulinas.	4
I.3. Proteína A.	5
I.3.1. Presencia de la proteína A en cepas de <i>Staphylococcus</i>	5
I.3.2. Proteína A de <i>S. aureus</i>	7
I.3.2.1. Producción de proteína A.	7
I.3.2.2. Propiedades físico-químicas.	9
I.3.2.3. Estructura de la proteína A.	12
I.3.3. Reactividad de la proteína A con inmunoglobulinas de distintos animales.	16
I.4. Inmunoglobulinas.	18
I.4.1. Estructura de inmunoglobulinas.	19
I.4.2. Genes de inmunoglobulinas.	21
I.4.2.1. Genes de regiones variables.	22
I.4.2.2. Genes de regiones constantes.	26
I.4.2.3. Genes de inmunoglobulinas activos.	28
I.4.3. Variantes de inmunoglobulinas.	30
I.4.4. Estructura tridimensional de inmunoglobulinas.	32
I.4.5. Fragmentos de inmunoglobulinas.	37
I.4.6. Producción de inmunoglobulinas en la diferenciación del linfocito.	40
I.4.7. Relaciones evolutivas de inmunoglobulinas. ...	44
I.4.8. Las clases de inmunoglobulinas humanas.	48
I.4.8.1. Inmunoglobulinas M.	48
I.4.8.2. Inmunoglobulinas A.	51
I.4.8.3. Inmunoglobulinas G.	53
I.4.8.4. Inmunoglobulinas E.	54
I.4.8.5. Inmunoglobulinas D.	55

I.5. Interacción proteína A-inmunoglobulinas.	56
I.5.1. Independencia de la función anticorpal.	56
I.5.2. Interacción con IgG a través de la región Fcγ.	58
I.5.3. Reactividad de las subclases de IgG.	60
I.5.4. Reactividad de otras clases de inmunoglobulinas con proteína A.	64
I.5.4.1. Inmunoglobulinas A.	64
I.5.4.2. Inmunoglobulinas M.	66
I.5.4.3. Inmunoglobulinas E.	69
I.5.4.4. Inmunoglobulinas D.	70
I.5.5. El mecanismo alternativo de interacción de inmunoglobulinas con proteína A a través de sus regiones F(ab') ₂	70
I.6. Actividad biológica de la proteína A.	73
I.6.1. Proteína A como mitógeno de linfocitos.	75
I.7. Objetivos y planteamiento experimental.	78
II. MATERIALES Y METODOS.	
II.1. Purificación de inmunoglobulinas.	80
II.1.1. Concentración de soluciones de proteína. ...	80
II.1.1.1. Ultrafiltración.	80
II.1.1.2. Diálisis.	81
II.1.1.3. Cálculo de concentración de las soluciones de proteína.	82
II.1.2. Purificación de IgG policlonal humana y de otros mamíferos.	82
II.1.2.1. Cromatografía de afinidad en PA-Sepharose.	82
II.1.2.2. Purificación de una IgG3 monoclonal humana.	84
II.1.2.2.1. Preparación del intercambiador iónico de celulosa.	86

II.1.2.2.2. Aislamiento de la IgG3 Fra.	87
II.1.2.3. Purificación de IgA policlonal humana.	89
II.1.2.4. Purificación de IgM policlonal humana.	90
II.1.2.4.1. Purificación de la IgM sin afinidad por PA-Sepharose.	96
II.1.2.5. Purificación de una IgM monoclonal humana.	96
II.1.2.6. Aislamiento de proteínas Bence-Jones. ...	98
II.2. Preparación de fragmentos de inmunoglobulinas. ...	100
II.2.1. De IgG humana.	100
II.2.1.1. Preparación de los fragmentos Fab γ y Fc γ	100
II.2.1.2. Obtención del fragmento F(ab') $_2\gamma$	101
II.2.1.3. Obtención del fragmento Fab' γ	104
II.2.1.4. Obtención de cadenas ligeras.	107
II.2.2. Fragmentos de IgM.	107
II.2.2.1. Obtención de los fragmentos Fab μ y (Fc) $_5\mu$	109
II.2.2.2. Obtención del fragmento F(ab') $_2\mu$	110
II.2.2.3. Obtención del fragmento Fab' μ	110
II.2.2.4. Obtención del fragmento Fc μ	111
II.2.2.5. Obtención del fragmento Fv.	112
II.2.2.6. Obtención de los dominios V $_H$ y V $_L$	112
II.2.2.7. Obtención de subunidades de IgM.	113
II.2.2.8. Obtención de cadenas ligeras Iz.	114
II.3. Obtención de antisueros y anticuerpos.	114
II.3.1. Inmunización de los animales.	115
II.3.2. Absorción de los antisueros.	118
II.3.2.1. Cromatografía de inmunoafinidad.	118
II.3.2.1.1. Insolubilización de antígenos en agarosa.	119
II.3.2.1.2. Inmunoabsorción y purificación de anticuerpos.	121

II.3.3. Insolubilización de anticuerpos en agarosa. ..	123
II.3.4. Obtención de fragmentos Fab de anticuerpos IgG.	124
II.3.4.1. Obtención de fragmentos Fab anti-proteína A.	127
II.4. Técnicas de inmunoprecipitación en gel.	127
II.4.1. Inmunodifusión doble en dos dimensiones.	130
II.4.2. Inmunodifusión radial simple.	132
II.5. Técnicas electroforéticas.	134
II.5.1. Electroforesis en agarosa.	135
II.5.1.1. Inmunoelectroforesis.	137
II.5.1.2. Inmunoelectroforesis cruzada.	137
II.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.	139
II.5.2.1. Electroforesis en un sistema de tamponamiento discontinuo.	140
II.5.2.2. Electroforesis en presencia de SDS.	142
II.5.3. Isoelectroenfoque.	144
II.5.3.1. Isoelectroenfoque en agarosa,	144
II.6. Marcaje radiactivo de proteínas,	146
II.6.1. Yodación con IodoGen.	146
II.6.2. Yodación enzimática,	148
II.6.3. Yodación de anticuerpos,	149
II.6.4. Calidad de las proteínas marcadas con ^{125}I . ..	150
II.6.5. Cálculo de la actividad específica.	152
II.7. Mapas bidimensionales de péptidos yodados.	154
II.7.1. Preparación de los péptidos radiactivos.	154
II.7.2. Electroforesis y cromatografía en capa fina. .	155
II.8. Radioinmunoensayos,	156
II.8.1. De doble anticuerpo,	157
II.8.2. De fase sólida.	158

II.9. Interacción con proteína A.	160
II.9.1. Fijación a células de <i>S. aureus</i>	161
II.9.2. Fijación a proteína A en placas de plástico.	163
II.9.3. Análisis de los datos de fijación.	163
II.9.4. Reacciones de precipitación y coprecipitación.	164
II.10. Materiales.	167
III. RESULTADOS Y DISCUSION.	
III.1. Interacción de IgM policlonal humana con proteína A.	170
III.1.1. IgM reactiva con proteína A.	170
III.1.1.1. Aislamiento de IgM por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose.	170
III.1.1.2. Utilización de tampones disociantes en la elución de IgM de PA-Sepharose.	173
III.1.1.3. Interacción con PA-Sepharose en función del pH.	176
III.1.1.4. Rendimiento de la purificación de IgM.	180
III.1.2. Fijación de IgM policlonal a células de <i>S. aureus</i>	184
III.1.2.1. Ensayos de fijación directa.	184
III.1.2.2. Determinación de la K_a del proceso de de fijación y comparación con la correspondiente de IgG policlonal. .	186
III.1.2.3. Capacidades de unión de IgM e IgG por <i>S. aureus</i>	190
III.1.2.4. Efecto del fragmento $F(ab')_2\gamma$ sobre la fijación de IgM.	193
III.1.3. Reacciones de coprecipitación y precipitación de IgM e IgG con proteína A.	195
III.1.3.1. Coprecipitación de IgM humana con proteína A y $Fc\gamma$	195
III.1.3.2. Precipitación directa de IgM con proteína A.	199

III.1.3.3. Precipitación directa de IgG con proteína A.	201
III.2. Sitios de proteína A para las reactividades clásica y alternativa.	203
III.2.1. Receptores de proteína A para $F(ab')_2\gamma$ y $Fc\gamma$.	203
III.2.2. Actividad del fragmento $Fab\gamma$ en los ensayos de fijación a <i>S. aureus</i>	210
III.2.3. Inhibición de la reacción de coprecipitación de IgM, $Fc\gamma$ y proteína A.	212
III.2.4. Efecto de la proteólisis de <i>S. aureus</i> sobre su interacción con inmunoglobulinas.	214
III.2.5. Efecto de anticuerpos anti-proteína A sobre la capacidad de fijación de inmunoglobulinas a <i>S. aureus</i>	216
III.3. Receptor de proteína A de una IgM monoclonal humana.	219
III.3.1. IgM Iz.	220
III.3.1.1. Cromatografía de IgM Iz en PA-Sepharose.	222
III.3.2. Fragmentos $Fab\mu$ y $(Fc)_5\mu$	224
III.3.2.1. Cromatografía de $(Fc)_5\mu$ y $Fab\mu$ en PA-Sepharose.	226
III.3.3. Precursores de $(Fc)_5\mu$ en la proteólisis de IgM.	229
III.3.3.1. Cromatografía de los precursores de $(Fc)_5\mu$ en PA-Sepharose.	234
III.3.4. Fragmentos $F(ab')_2\mu$	237
III.3.4.1. Cromatografía de $F(ab')_2\mu$ en PA-Sepharose.	240
III.3.5. Subunidades de IgM.	240
III.3.5.1. Cromatografía de IgM monomérica y $Fab'\mu$ en PA-Sepharose.	243
III.3.6. Inhibición competitiva de la fijación de IgM $\{^{125}I\}$ a proteína A.	249
III.3.7. Subfragmentos de la región Fab	253
III.3.7.1. Obtención del fragmento Fv.	255

III.3.7.2. Obtención de los dominios V_H y V_L	261
III.3.8. Inhibición competitiva de la unión de IgM $\{^{125}I\}$ a proteína por subfragmentos de Fab μ .266	
III.3.9. Inhibición de la coprecipitación de la IgM Iz con proteína A y Fcy por subfragmentos de Fab μ .269	
III.3.10. Inhibición de la fijación de IgM Iz a proteína A por anticuerpos anti- V_H	269
III.4. Receptor de proteína A en estructuras de dominios variables de cadenas pesadas.	274
III.4.1. Inhibición de la interacción proteína A- IgM policlonal por anticuerpos anti-Fab μ . .	275
III.4.2. Inhibición de la fijación de IgM policlonal a proteína A por anticuerpos anti- V_H	277
III.4.3. Reactividad anti-"framework" de los anticuerpos que inhiben la interacción IgM-proteína A.	282
III.4.4. Relación de los sitios antigénicos en regiones "framework" de V_H y reactividad con proteína A.287	
III.4.5. Sitios antigénicos reconocidos por anticuerpos anti-"framework" humanos en inmunoglobulinas de otros mamíferos con reactividad tipo Fab con proteína A.	293
III.5. Discusión general,	296
III.5.1. IgM policlonal reactiva con proteína A.	297
III.5.2. Sitios de proteína A para las reactividades clásica y alternativa.	300
III.5.3. Receptor de proteína A de la IgM monoclonal Iz.	303
III.5.4. Receptor de proteína A en los dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulinas.	305
IV. CONCLUSIONES.	317
V. BIBLIOGRAFIA.	321

ABREVIATURAS

BSA:	seroalbúmina bovina
C:	dominio constante de inmunoglobulinas segmentos génicos que los codifican
C _H :	dominio constante de cadena pesada
C _L :	dominio constante de cadena ligera
CBB:	azul brillante de Coomassie
CDR:	regiones determinantes de complementaridad
CM:	carboximetil
DEAE:	dietilaminoetil
DNP:	dinitrofenil
DPCC:	cloruro de difenilcarbamato
DTT:	ditiotreitol
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
fmol:	femtomol (10^{-15} mol)
Fw:	regiones "framework"
GO:	glucosa oxidasa
H:	cadena pesada de inmunoglobulinas
Hv:	regiones hipervariables
Ig:	inmunoglobulinas
IodoGen:	1,3,4,6-tetracloruro-3 α ,6 α difenilglicoluril
Kpb:	kilopares de bases
L:	cadenas ligeras de inmunoglobulinas
LPO:	lactoperoxidasa oxidasa
mCi:	milicurio
M _R :	peso molecular
mS:	milisiemen
PA:	proteína A de <i>S. aureus</i>
PBSA:	tampón fosfato descrito en la tabla II.2.
PBSA-BSA:	tampón PBSA con BSA 1mg/ml.
PEG:	polietilenglicol
pI:	punto isoeléctrico
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVC: cloruro de polivinilo
p/v: peso/volumen
rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TA: tampón Tris-HCl descrito en la tabla II.2.
TCA: ácido tricloroacético
TEMED: N-N-N'-N'-tetrametilendiamina
Tris: tris-(hidroximetil)aminometano
V: dominio variable de inmunoglobulinas
segmentos génicos que los codifican
V_H: dominio variable de cadena pesada
V_L: dominio variable de cadena ligera
v/v: volumen/volumen
w: watio

INTRODUCCION

- I.1. Presentación del trabajo.
- I.2. Bacterias con receptores para proteínas de suero.
- I.3. Proteína A.
- I.4. Inmunoglobulinas.
- I.5. Interacción proteína A-inmunoglobulinas.
- I.6. Actividad biológica de la proteína A.
- I.7. Objetivos y planteamiento experimental.

I.1. PRESENTACION DEL TRABAJO

Con la denominación de proteína A se designó más precisamente, en 1964 (Grosv y col., 1964; Oeding y col., 1964), un componente altamente antigénico de *Staphylococcus aureus*, aislado en un intento de clasificación serológica de cepas de estafilococos y que mostraba la peculiaridad de reaccionar con sueros de conejos o humanos sin inmunización previa (Jensen, 1958). Así, se hacía referencia a su naturaleza más acertadamente que con la ambigua denominación anterior de antígeno A (Jensen, 1958).

Si bien la reactividad observada fue inicialmente atribuida a anticuerpos de entre los presentes en condiciones normales en sueros humanos, contra distintos elementos bacterianos (Jensen, 1958), se trata, en realidad, de un fenómeno no relacionado con la actividad anticorporel de las inmunoglobulinas (Forsgren y Sjoquist, 1966).

La reactividad de la proteína A de *S. aureus* con inmunoglobulinas de numerosos mamíferos (Kronvall y col., 1970a), le abrió un amplio campo de aplicaciones metodológicas inmunoquímicas (Goding, 1978), pero, además, y quizá también asociada a su interacción con inmunoglobulinas, la proteína A posee un conjunto de actividades biológicas ligadas al sistema inmune, de las que su propiedad de agente antitumoral es de las más espectaculares (Ray y Bandyopadhyay, 1983).

El presente estudio, que aborda aspectos de esta reactividad referidos a las estructuras de la proteína A y de las inmunoglobulinas en ella implicadas, se introduce por medio de tres grandes bloques descriptivos de los elementos interesados, proteína A e inmunoglobulinas, y de la información disponible sobre su interacción. El relativo a proteína A incide en la estructura de su molécula y su producción por células de *S. aureus*. Las inmunoglobulinas, a su vez, se contemplan desde la perspectiva de la estructura de sus genes y su expresión, fundamental para la comprensión de la heterogeneidad de sus moléculas, así como de sus relaciones evolutivas. Finalmente, la reactividad proteína A-inmunoglobulinas se expone en base a los dos mecanismos de interacción descritos y a la actividad biológica mostrada por la proteína A en alguna de las funciones del sistema inmune.

I.2. BACTERIAS CON RECEPTORES PARA PROTEINAS DE SUERO

Se ha descrito en los últimos años la existencia en la superficie de algunos grupos de bacterias de estructuras capaces de unir proteínas del suero de mamíferos (Wideback y col., 1982; Richman y col., 1982). Suele tratarse de microorganismos Gram positivos potencialmente patógenos, como estafilococos y estreptococos, sobre todo, y algunos Gram negativos.

Esta interacción con estructuras de la superficie bacteriana comprende un amplio conjunto de proteínas de suero. Así, cepas de estreptococos de los grupos G y C (grupos serológicamente caracterizados por las especificidades antigénicas de los carbohidratos de sus paredes celulares (McCarty, 1980)) reconocen albúminas (Myhre y Kronvall, 1980a; Wideback y col., 1982). Estas y las del grupo A unen fibrinógeno (Kronvall y col., 1979) aunque a través de sitios diferentes de los que unen β_2 -microglobulina (Kronvall y col., 1978). Algunos estreptococos también unen haptoglobina (Kohler y Prokop, 1978), y el C1q, primer componente del sistema del complemento, interacciona con algunos neumococos (Loos y col., 1978). Estructuras que unen inmunoglobulinas se encuentran en estafilococos y estreptococos (apartado I.2.1.) y la fibronectina también se une a cepas de estafilococos (Doran y Reynor, 1981).

El significado de estas interacciones así como su

efecto sobre las relaciones con el huésped animal no están aclaradas, si bien se sabe que la unión de estas proteínas a los microorganismos induce cambios en las propiedades físico-químicas de su superficie (Miorner y col., 1980) y que de ello pueden derivarse alteraciones en su interacción con células fagocíticas (Smith, 1977) que, en último término, podrían incidir sobre su patogenicidad.

I.2.1. Receptores de inmunoglobulinas.

De todas las interacciones entre componentes de la superficie bacteriana y proteínas de suero de mamíferos, las correspondientes a inmunoglobulinas y receptores de estafilococos y estreptococos son las mejor estudiadas (Langone, 1982).

En la superficie de estos microorganismos se encuentran diversas estructuras receptoras de inmunoglobulinas, de acuerdo con los distintos patrones de reactividad observados entre las distintas cepas y los distintos tipos de inmunoglobulinas. Esto permite su sistematización en cinco tipos de receptores (Myhre, 1981): los de tipo I se encuentran en estafilococos, y los restantes en estreptococos. Así, los de tipo II se hallan en los del grupo A, cepas de los grupos C y G humanos y C bovino tienen receptores tipo III, en tanto que los de tipo IV y V están restringidos al grupo G bovino y a cepas del grupo C equino, respectivamente.

Aunque recientemente se ha purificado un receptor tipo II (Grubb y col., 1982), la interacción extensivamente estudiada es la que ocurre con el receptor tipo I o proteína A de *Staphylococcus aureus* (Forsgren y Sjoquist, 1966), de lo que puede dar una idea el hecho de que se trata de un producto comercializado cuyas características le han convertido en un reactivo inmunoquímico generalizado, como anti-inmunoglobulina, utilizado en procedimientos cromatográficos, enzimo o radioinmunoensayos y técnicas microscópicas, entre otras (Goding, 1978).

I.3. PROTEINA A

I.3.1. Presencia de la proteína A en cepas de *Staphylococcus*.

Los organismos del género *Staphylococcus*, el más importante de la familia de cocos Gram positivos *Micrococcaceae*, son anaerobios facultativos no móviles, que por su división celular en tres planos sucesivamente perpendiculares forman, sobre todo en medios sólidos, agrupamientos irregulares de los que deriva su denominación de estafilococos (Morse, 1980).

El estudio de la distribución de la proteína A entre los distintos estafilococos, generalmente por procedimientos cualitativos, asocia su producción a organismos de *S. aureus* (tabla I.1.), de manera que su presencia constituye, con la actividad coagulasa y nucleasa termoestable, el principal criterio de identificación de *S. aureus* de origen humano (biotipo

Tabla I.1. PRODUCCION DE PROTEINA A POR DISTINTOS GRUPOS DE ESTAFILOCOCOS

Estafilococo	Origen	% con PA ^a	Referencia ^c
<i>S. aureus</i>	humano (biotipo A)	70-100	1,2,3,6
<i>S. aureus</i>	humano	0-2 ^b	1
<i>S. aureus</i>	bovino (biotipo C)	34-64	3,6
<i>S. aureus</i>	otros	2-99	3,4
<i>S. epidermidis</i>	humano	0	5
<i>S. epidermidis</i>	bovino	1-9	6
<i>S. intermedius</i>	perro, paloma	3	3
<i>S. hyicus</i>	humano	97	7
<i>S. hyicus</i>	otros	0	3

- a) la presencia de proteína A se ha detectado en ensayos de aglutinación de eritrocitos cubiertos de IgG, de fijación a las bacterias de IgG marcada radiactiva o fluorescentemente, y por difusión en gel.
- b) se trata de cepas coagulasa y DNAasa negativas.
- c) 1, Forsgren, 1970; 2, Kronvall y col., 1971; 3, Lachica y col., 1979; 4, Bornstein y col., 1980; 5, Flandrois y col., 1975; 6, Kronvall y col., 1972; Muller y col., 1981,

A), ya que la PA puede detectarse en el 95% de las cepas (Kronvall y col., 1971).

Aunque hay cierta disparidad en los resultados sobre la extensión de la producción de PA por cepas de *S. aureus* de origen animal, entre las de biotipo C o bovino se encuentra persistentemente una fracción de cepas productoras (Kronvall y col., 1972).

La presencia de PA en otros estafilococos distintos de *S. aureus* es bastante rara (tabla I.1.). Hay que señalar, no obstante, que el carácter PA positivo mayoritario de las cepas de *S. hyicus* de origen humano, se halla relacionado con la producción de un polipéptido antigénicamente relacionado con la PA y que muestra la reactividad con inmunoglobulinas característica de la PA, pero con propiedades estructurales diferentes (Muller y col., 1981).

I.3.2. Proteína A de *S. aureus*.

I.3.2.1. Producción de proteína A.

S. aureus, así denominado por la pigmentación de sus colonias crecidas aeróbicamente en medios sólidos, es colonizador habitual de humanos y animales y de los más importantes por su patogenicidad, siendo responsable de gran variedad de enfermedades supurativas (Morse, 1980).

La mayoría de la PA producida por *S. aureus* se

halla asociada a su pared celular, aunque una pequeña cantidad también puede encontrarse extracelularmente en el medio de cultivo. Así, en los organismos Cowan I, una cepa de *S. aureus* de alto contenido en PA, sólo el 10% de la PA celular está en su citoplasma y un 30% del total es liberado al medio durante la fase logarítmica de crecimiento y principio de la fase estacionaria (Forsgren, 1969).

Excepcionalmente, las cepas resistentes a meticilina, o no producen PA o lo hacen solamente en forma extracelular (Winblad y Ericsson, 1973).

La PA de la pared celular, donde se encuentra unida covalentemente a su porción peptidoglicano (Sjoquist y col., 1972b), puede contemplarse en la superficie celular por la observación microscópica de organismos cubiertos con anticuerpos contra antígenos visibles al microscopio electrónico (Umeda y col., 1980).

La PA, tras su síntesis ribosomal, se incorpora rápidamente a la pared celular, aunque su producción es independiente de la de peptidoglicano (Movitz, 1974). Asimismo, protoplastos de Cowan I o 3695, tienen una velocidad de producción de PA similar a la de las bacterias intactas, en las que la mayoría de la PA se encuentra en la pared celular (Movitz, 1976).

Las propiedades de mutantes deficientes en PA obte-

nidos por tratamiento de cepas Cowan I con nitrosoguanidina o etilmetano sulfonato, sugiere la existencia en *S. aureus* de un mecanismo común regulador de la síntesis y liberación de productos extracelulares, incluida la PA (Forsgren y col., 1971).

El medio y condiciones de cultivo tienen una gran incidencia en el grado de producción de PA (Lind, 1974; Flandrois y col., 1978), siendo característica la reducción observada al aumentar la concentración de cloruro sódico (Lind, 1974).

I.3.2.2. Propiedades físico-químicas.

El aislamiento y caracterización de la PA ha dependido del procedimiento de su extracción de la pared celular, pues de la mayoría de ellos resultaban productos heterogéneos de actividad disminuida (Grosv y col., 1964; Forsgren y Sjoquist, 1969).

Sin embargo, el tratamiento de células Cowan I con lisostafina, una mezcla de proteínas producidas por *Staphylococcus staphylolyticus*, con actividades glicilglicocola endopeptidasa, hexosaminidasa y N-acetilmuramil-L-alanina amidasa (Sloan y col., 1977) que lisa las células de *S. aureus* al hidrolizar los puentes de pentaglicina que conectan los tetrapéptidos anclados en el esqueleto polisacárido del peptidoglicano de la pared celular (Leive y Davis, 1980), produce una

PA que tras su purificación por procedimientos cromatográficos convencionales aparece homogénea (Sjoquist y col., 1972a).

La PA así liberada de la pared celular, o la del medio de cultivo de Cowan I o de cepas productoras sólo de PA extracelular, se aísla en la actualidad por cromatografía de afinidad con IgG-Sepharose (Hjelm y col., 1972).

La PA de la cepa Cowan I, que constituye el 6.7% en peso del material de su pared celular (Sjoquist y col., 1972b), la mejor estudiada, es una molécula alargada, como puede deducirse de sus parámetros hidrodinámicos, viscosidad intrínseca y relación friccional, que se muestran en la tabla I.2., junto con otras características físico-químicas.

En general, la PA de Cowan I se parece bastante a las producidas por otras cepas (Movitz, 1976), incluyendo las formas extracelulares de cepas meticilina-resistentes, como la A676 (Lindmark y col., 1977). En todos los casos, los pesos moleculares estimados por SDS-PAGE dan valores de 55000-56000, superiores a los observados por ultracentrifugación o cromatografía, en torno a 41000-42000, más acordes con los calculados de su composición de aminoácidos (tabla I.2.). No obstante, aunque los extremos amino y carboxilo terminales son comunes, Ala y Lys, respectivamente, en las formas celular y extracelular de PA (Sjoquist y col., 1972a; Lindmark y col., 1977; Movitz y col., 1979) la Ala de la PA aislada de

Tabla I.2. ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE
LA PROTEINA A

	Cowan I(1)	A676(3)
Peso molecular		
equilibrio de sedimentación y filtración en 6M GuHCl.	42000	41000
análisis de aminoácidos	41942(2), 43491(3)	40736
SDS-PAGE	54000(4)	55000
$A_{275}^{1\%, 1\text{ cm}}$	1.65(2)	1.46
Punto isoeléctrico	5.1(3)	5.09
$S_{20,w}, S$	2.1	-
Coeficiente de fricción relativo	2.1	-
Viscosidad intrínseca, ml/g	29	-
Coeficiente de difusión, $D_{20,w}, \text{cm}^2/\text{s}$	4.3×10^{-7}	-

La proteína A de la cepa Cowan I es la aislada después del tratamiento de las bacterias con lisostafina (2).

La referencia de los datos es la que acompaña el nombre de las cepas, si no se indica otra.

Referencias: 1, Bjork y col., 1972; 2, Sjoquist y col., 1972; 3, Lindmark y col., 1977; 4, Duggleby y Jones, 1983.

la pared celular con lisostafina tiene su extremo amino bloqueado (Sjoquist y col., 1972a).

Es una proteína sin Trp, por ello su bajo coeficiente de extinción, tabla I.2., y sin Cys, con una estabilidad conformacional sorprendente, como muestran estudios sobre el efecto del pH, en un intervalo de 0.99-11.8, en su espectro de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano (Sjoholm, 1975), que, asimismo, muestran una mayoritaria recuperación de la conformación nativa después del tratamiento de la PA con clorhidrato de guanidina 6M o calefacción a 80 °C. La estructura secundaria de la PA, estimada de su espectro de dicroísmo circular, consta de un 31% de α -hélice, un 13% de estructura β y un 50% de estructura apéridica, tanto si se trata de la forma unida a la pared celular de Cowan I como de la extracelular de la cepa A676 (Lindmark, 1982).

I.3.2.3. Estructura de la proteína A.

La molécula de PA está constituida por dos regiones bien diferenciadas, una de unos 150 aminoácidos, que comprende su extremo C-terminal, denominada región X, y otra que contiene 4 subregiones homólogas, denominadas D, A, B y C, de aproximadamente 60 aminoácidos cada una, dispuestas linealmente por ese orden desde el extremo N-terminal, figura I.1. (Sjodhal, 1977a).

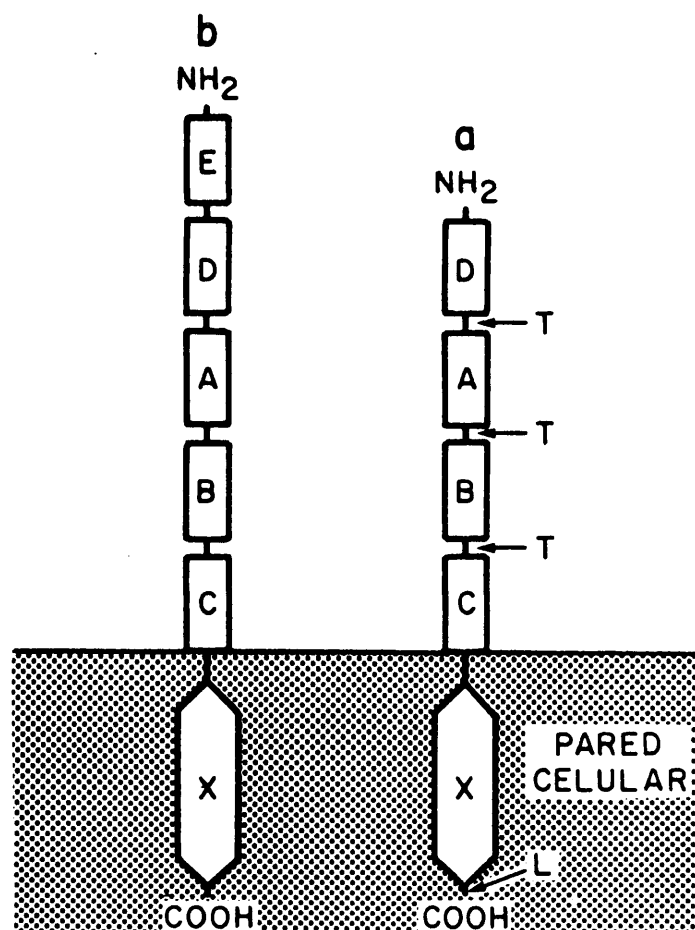


Figura I.1. Representaciones esquemáticas de la proteína A en la superficie de *S. aureus*, según la estructura definida a partir de la secuencia de aminoácidos de la de la cepa Cowan I (a) y de la deducida de la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína A de la cepa 8325 (b). Las flechas muestran los puntos de hidrólisis por tripsina, T, y lisostafina, L. Las otras letras corresponden a la denominación de cada uno de los dominios de la proteína A (Sjodahl, 1977a; Lofdahl y col., 1983).

Como el dominio C y la región X no se producen en la digestión de los organismos con tripsina, sino sólo después de su tratamiento con lisostafina, se ha sugerido que son adyacentes y que la región X se encuentra incluida en la pared celular (Sjodahl, 1977a).

Los dominios D, A, B, y C muestran reactividad con IgG, a diferencia de la región X (Sjodahl, 1977a), aunque con carácter monovalente, explicando la capacidad de la PA intacta para unir más de una molécula de IgG (Sjoquist y col., 1972a).

La identidad antigénica de estos dominios se halla de acuerdo con la alta homología existente entre sus secuencias, superior al 80%, y que determina estados conformacionales similares entre sí y al de la estructura secundaria de la PA (Sjodahl, 1977b; Lindmark, 1982), en tanto que el correspondiente de la región X es bastante diferente, de acuerdo con su distinta composición de aminoácidos (Sjodahl, 1977a).

La homología entre los dominios con reactividad con IgG es mayor cuanto más próximos se hallan en la molécula, motivo por el que se ha interpretado el origen genético de la PA como el resultado de la duplicación de un gen primordial correspondiente al de su extremo N-terminal (Sjodahl, 1977b).

Esta disposición estructural de la PA de Cowan I se halla corroborada por la secuencia parcial de nucleótidos

del gen de PA de *S. aureus* 8325 que, sin embargo, muestra una región adicional, homóloga de las otras cuatro repetidas, y en posición N-terminal respecto de ellas (Lofdahl y col., 1983), sospechada por la presencia de un aminoácido N-terminal bloqueado en la PA aislada por tratamiento de los organismos con lisostafina (Sjoquist y col., 1972a; Movitz, 1979). La estructura de este gen contiene un péptido hidrófobo o secuencia de señal que precede a la del polipéptido maduro, así como un codón de iniciación y una secuencia de reconocimiento del ribosoma, similares a las correspondientes de otros genes de bacterias Gram positivas (Lofdahl y col., 1983).

54671
La estructura tridimensional de las regiones de homología reactivas con IgG, determina un dominio globular cilíndrico de $26 \times 16 \text{ \AA}$, constituido principalmente por dos hélices alfa antiparalelas y el resto del polipéptido plegado irregularmente, como se deduce del análisis cristalográfico del patrón de difracción de rayos X del cristal formado por el fragmento Fc de IgG humana (apartado I.4.5.) y el dominio B de la PA (Deisenhofer y col., 1978; Deisenhofer, 1981). La forma extendida de la PA y la gran semejanza de las propiedades espectrales de los distintos dominios, permite suponer que se hallen dispuestos secuencialmente, sin interaccionar entre sí, de acuerdo con la flexibilidad apreciada en las estructuras de los extremos N y C-terminal del fragmento B (Deisenhofer y col., 1978).

I.3.3. Reactividad de la proteína A con inmunoglobulinas de distintos animales.

Aunque inicialmente observada con inmunoglobulinas humanas y de animales de laboratorio, conejos, cobayos, etc. (Jensen, 1959; Forsgren y Sjoquist, 1967; Forsgren, 1967), el análisis de la reactividad de PA con las inmunoglobulinas de otros animales muestra una de las características de esta interacción, que es su amplia distribución en los distintos grupos de vertebrados. La relación de reactividades que se muestra en la tabla I.3. revela a los mamíferos como grupo con representación principal de especies con inmunoglobulinas reactivas con PA, a pesar de que también pueden encontrarse en las de algunos vertebrados inferiores, como anfibios y aves (Kronvall y col., 1970a; Zikan y col., 1980).

La totalidad de los órdenes de mamíferos ensayados tienen inmunoglobulinas con alguna forma de reactividad con PA, aunque con grandes diferencias entre ellas, observadas en los estudios cualitativos iniciales (Kronvall y col., 1970a) y que en los ensayos cuantitativos más sensibles, reflejan rangos de afinidad por la PA de tres órdenes de magnitud (Langone, 1978; Inganas y col., 1980; Richman y col., 1982; Lindmark y col., 1983), encontrándose entre las de primates, carnívoros y roedores algunas de las inmunoglobulinas que interaccionan más fuertemente con la PA, frente a las de artiodáctilos y otros órdenes con reactividades más débiles.

Tabla I.3. REACTIVIDAD DE INMUNOGLOBULINAS DE DISTINTOS

GRUPOS ANIMALES CON PROTEINA A

<u>Positivos</u>	<u>Negativos</u>
<u>Mamíferos</u> (1,2)	<u>Aves</u> (1,3,4)
-Euterios	-Paleognatos
<i>Insectivora</i>	(<i>Rheiformes</i>)
<i>Dermoptera</i>	-Neognatos
<i>Quiroptera</i>	(<i>Gallus</i>)
<i>Primates</i>	<u>Reptiles</u> (1)
<i>Edentata</i>	-Anapsides
<i>Pholidota</i>	-Lepido-aurides
<i>Lagomorpha</i>	-Arcosaurios
<i>Rodentia</i>	<u>Anfibios</u> (1,4)
<i>Cetacea</i>	<i>Rana</i> , no
<i>Carnivora</i>	<i>Xenopus</i> , si
<i>Pinnipedia</i>	<u>Peces</u> (1,4)
<i>Tubulidentata</i>	-Agnatos
<i>Proboscidea</i>	-Condriictios
<i>Hyracoidea</i>	-Osteictios (<i>Cyprinus</i>)
<i>Perissodactyla</i>	
<i>Artiodactyla</i>	
-Metaterios	
<i>Marsupalia</i>	
-Prototerios	
<i>Monotremata</i>	

Se muestran sólo aquellos órdenes que incluyen especies con reactividad ensayada, la cual, entre las positivas, puede ser muy variable dentro de un mismo orden (1,2). Los órdenes entre paréntesis en la columna de reactividad negativa son excepciones, e incluyen especies con reactividad positiva.

Referencias: 1, Kronvall y col., 1970a; 2, Richman y col., 1982; 3, Kronvall y col., 1974; 4, Zikan y col., 1980.

La cromatografía de afinidad con PA-Sepharose es el procedimiento que ha permitido extender la reactividad con PA a las inmunoglobulinas de vertebrados inferiores, como peces y anfibios (Zikan y col., 1980).

I.4. INMUNOGLOBULINAS

Son glicoproteínas de origen animal con actividad anticuerpo como propiedad efectora característica, aunque participan, además, en otros aspectos de la inmunidad humoral o funciones del sistema inmune de los animales vertebrados no mediadas exclusivamente por células.

Se encuentran de dos modos diferentes: en la membrana de los linfocitos, como receptor de antígeno, y en circulación, sangre u otros fluidos corporales, como anticuerpo secretado por células derivadas de los linfocitos, desempeñando su función anticorpal, así como otras secundarias a la unión de antígeno, como la activación del sistema del complemento (Eisen, 1980a).

Las inmunoglobulinas de vertebrados forman una familia bastante heterogénea de proteínas. No obstante, siguen un patrón estructural común, que puede ilustrarse con la información obtenida de las mejor estudiadas que son las inmunoglobulinas humanas y de ratón.

I.4.1. Estructura de inmunoglobulinas.

Se hallan constituidas por dos polipéptidos de distinto tamaño: uno de 50000-70000 de peso molecular o cadena pesada (H) y el otro de 23000-25000 o cadena ligera (L), siendo el tetrámero de dos cadenas H idénticas unidas entre sí y a dos cadenas L, también idénticas, por puentes disulfuro, figura I.2., la unidad estructural básica.

(Putnam, 1977a).

Ambos polipéptidos, H y L, se disponen plegados en varias unidades globulares con secuencias homólogas o dominios de homología (Edelman, 1970), de unos 110 aminoácidos cada una y con un característico puente disulfuro intracadena. De la mayor variabilidad de la secuencia de los dominios correspondientes a los extremos N-terminal de cada cadena viene su denominación de regiones variables, V_H y V_L , y de regiones constantes a los otros dominios, uno en la cadena ligera, C_L , y 3 o 4 para las cadenas pesadas, C_H (Putnam, 1977a).

En los dominios V se encuentran tres segmentos de máxima variabilidad en cortas secuencias de 5-10 aminoácidos, zonas hipervariables, también conocidas como regiones determinantes de complementaridad (CDR), ya que son las que definen los sitios de unión de los antígenos, en la asociación V_H-V_L (Ray y Cebra, 1972; Padlan y col., 1973).

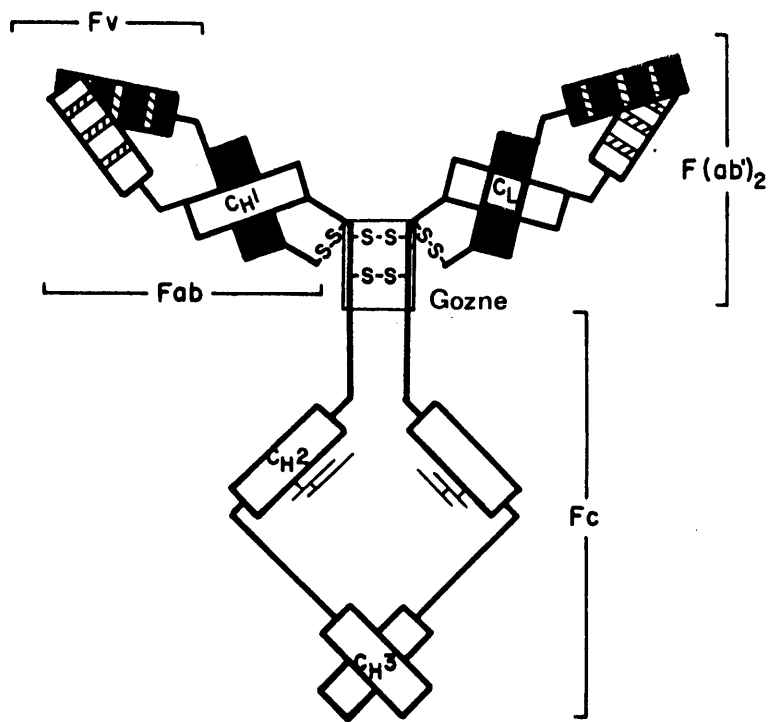


Figura I.2. Representación esquematizada de una molécula de IgG.

Los rectángulos corresponden a los distintos dominios de homología de las cadenas pesadas, en blanco, y ligeras, en negro, identificándose por su abreviatura los de las regiones constantes. Los puentes disulfuro entre cadenas son los de la IgG1 humana. El apareamiento de dominios y su disposición trata de adaptarse a la conformación espacial de la IgG. Los dominios variables tienen franjas que señalan las regiones determinantes de complementaridad. Sobre los dominios C_H2 se indican las cadenas de oligosacáridos. Se muestran, asimismo, las regiones y fragmentos más características de la molécula. Adaptado de Marquart y Deisenhofer, 1982.

Las regiones constantes, en cambio, presentan una variación restringida a unas pocas secuencias, cadenas μ , α , γ , δ y ϵ , que determinan las distintas clases de inmunoglobulinas, IgM, IgA, IgG, IgD e IgE, respectivamente, con propiedades biológicas diferentes. Algunos de estos tipos de cadenas constan de varias relacionadas que definen las subclases de inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas (Putnam, 1977a). El tipo de cadena ligera, λ o κ , también vienen definidos por la estructura del dominio C_L , asociándose indistintamente con cualquiera de las cadenas pesadas (Putnam, 1977a).

Aunque la forma H_2L_2 es la habitual en inmunoglobulinas circulantes, las cadenas pesadas de algunas clases tienen una pequeña prolongación en su extremo C-terminal que permite la polimerización de esas unidades monoméricas básicas, apareciendo entonces en forma de dímeros o trímeros, IgA, y pentámeros, IgM (Koshland, 1975). Sin embargo, en la superficie del linfocito, todas las clases de inmunoglobulinas se encuentran como monómeros y su cadena pesada tiene en su extremo C-terminal un corto segmento adicional, no presente en las formas circulantes, por donde se insertan en la membrana plasmática del linfocito (Tyler y col., 1982).

I.4.2. Genes de inmunoglobulinas.

El clonaje molecular y la caracterización estructu-

ral de los genes de inmunoglobulinas, ha contribuido decisivamente a la comprensión de la diversidad de esta familia de proteínas, expresada fundamentalmente en su capacidad para unir un enorme número de antígenos distintos, así como en la variedad de reacciones inmunológicas que pueden iniciar. Asimismo, estos estudios han aportado pautas significativas sobre la historia evolutiva de las inmunoglobulinas.

El sistema de genes de inmunoglobulinas de ratón y humano son los mejor conocidos y comprenden tres grupos de ligamiento distintos, uno para las cadenas pesadas y otro para cada tipo de cadena ligera, λ y κ , situados, respectivamente, en los cromosomas 12, 16 y 6 de ratón y en los 14, 22 y 2 de humano (Honjo, 1983).

I.4.2.1. Genes de regiones variables.

Las regiones variables de las cadenas ligeras son codificadas por dos segmentos separados de DNA, denominados V y J (Tonegawa y col., 1978; Max y col., 1979) y las de las cadenas pesadas, además de por segmentos V y J similares, por un segmento D adicional (Early y col., 1980).

Cada segmento V comprende dos exones o secuencias codificantes, de los que el situado en su extremo 5', determina los aminoácidos -19 a -5 de la secuencia de señal que precede al aminoácido N-terminal de la cadena ligera o pe-

sada y que es escindido durante la traducción, en tanto que el otro codifica el resto de la secuencia de señal y la mayoría del dominio variable, residuos -4 a 95-100 (Tonegawa y col., 1978). Estos exones del gen V se denominan L y V, respectivamente.

Los segmentos J, así denominados porque definen la secuencia de unión entre regiones variables y constantes, codifican 13-21 aminoácidos en las cadenas pesadas y 12 en las cadenas ligeras (Honjo, 1983).

Los segmentos D, de diversidad, definen primariamente los fragmentos de distinta longitud correspondientes a la última región hipervariable, entre las secuencias codificadas por los segmentos V_H y J_H (Early y col., 1980).

Los segmentos V se encuentran presumiblemente en el extremo 5' de cada uno de los grupos de ligamiento con los genes de cadenas H y L, a una distancia indeterminada de los segmentos J, figura I.3., y aunque su número exacto no es conocido pueden ser varios centenares (sólo 2 V_λ , sin embargo, en ratón)(Honjo, 1983). Los segmentos V_H se disponen en tándem, separados entre sí por secuencias intermedias no codificantes, intrones, de unos 15 Kpb, agrupados en familias multigénicas de genes del mismo subgrupo V_H (Rechavi y col., 1982) que parecen guardar relación con los subgrupos de regiones V_H definidos por el análisis comparado de las

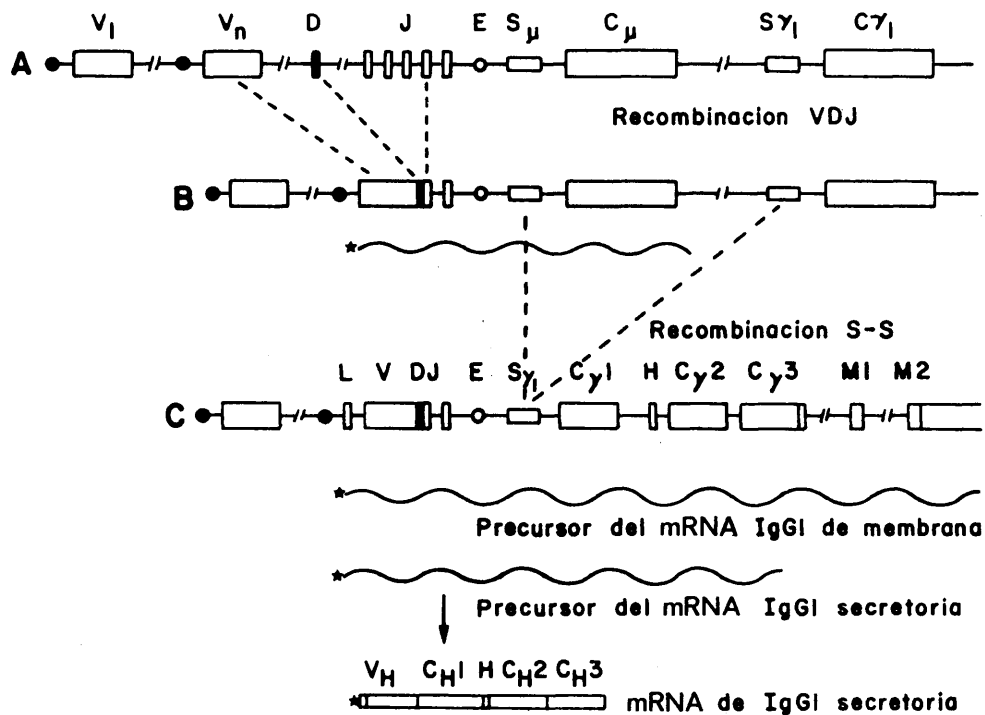


Figura I.3. Esquema de la producción de genes activos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas y de su transcripción. En A, B, y C, se muestran las estructuras de los DNA correspondientes a la línea germinal, a células B productoras de cadenas μ y a células en las que se ha producido el cambio de clase de inmunoglobulina expresada, respectivamente. El gen de región variable resulta de la recombinación de segmentos V, con su promotor, (\bullet), D y J, tras la que se activa la transcripción del gen μ activo, bajo control de la secuencia "enhancer", E (\circ). La secuencia E se conserva en el intrón del gen γ_1 creado a partir de la recombinación entre regiones S, S_μ y S_γ . Los exones de los genes de cadena pesada se han esquematizado sobre el caso del γ_1 , siendo V y C los correspondientes a los dominios variables y constantes,

Figura I.3. (continuación), L a la secuencia de señal, y H a la región gozne. Como unidades transcripcionales complejas que son pueden dar lugar a dos mRNA. uno para IgG1 secretoria y otro para la de la superficie del linfocito, que incluye los exones de membrana, M1 y M2. Las secuencias no codificantes de estos RNA son escindidas para dar lugar al mRNA definitivo. (★) representa los "caps" del extremo 5' de los RNA. Todo el esquema basado en uno de Gillies y col., 1983, ampliado con información de Sakano y col., 1983, de Tyler y col., 1982 y Kemp y col., 1983.

secuencias de aminoácidos (apartado I.4.3.; Capra y Kehoe, 1975).

Hay muchos menos segmentos J, 4-7 funcionales junto a algunos pseudogenes J (genes inactivos de secuencia relacionada con la del gen funcional) agrupados densamente en un conjunto muy próximo, a unos 3 Kpb, del extremo 5' del de los genes de regiones constantes (figura I.3.; Sakano y col., 1980; Hieter y col., 1982), si bien el sistema de genes de cadenas λ de ratón se aparta excepcionalmente de esta configuración (Elliott y col., 1982).

El número preciso de segmentos D es desconocido, así como su localización respecto de los otros elementos del sistema de genes de cadenas pesadas, aunque 11 de ellos, pertenecientes a tres familias de segmentos D, agrupados en una corta región del genoma de ratón, adyacente al extremo 5' del conjunto de segmentos J_H (Wood y Tonegawa, 1983). Los segmentos D humanos descritos, también parecen organizados en familias de genes (Siebelinst y col., 1981).

I.4.2.2. Genes de regiones constantes.

Las regiones constantes κ de humano y ratón son codificadas por un único gen situado a 2.1-2.3 Kpb del borde 3' de los segmentos J_κ (Max y col., 1979, Hieter y col., 1982), mientras que se encuentran múltiples genes, 4-6, para

las regiones constantes λ , asociados a sus propios segmentos J_λ (Hieter y col., 1981).

El sistema de genes que codifican las regiones constantes de las cadenas pesadas contiene varios genes que comparten un único conjunto de segmentos J_H (Shimizu y col., 1981). El de ratón tiene 8 genes, tantos como tipos de cadenas pesadas, correspondientes a 5 clases de inmunoglobulinas, una de ellas, la G, con 4 subclases, agrupados en un segmento de 200 Kpb en el orden 5' - μ - δ - γ_3 - γ_1 - γ_{2b} - γ_{2a} - ϵ - α - 3' (Shimizu y col., 1981). En humano, además de los 9 genes de cada cadena pesada, 5 clases de inmunoglobulinas, 1 con 2 subclases, IgA, y otra con 4, IgG, se encuentran, al menos, 3 pseudogenes, uno $\psi\gamma$ y dos $\psi\epsilon$ (Flanagan y Rabbits, 1982). Su disposición en el genoma, a pesar de no estar completamente establecida, difiere de la observada para los genes C_H de ratón, encontrándose mezclados genes γ , ϵ y α , en el orden 5' - μ - δ - - - γ_3 - γ_1 - $\psi\epsilon_1$ - α_1 - - - γ_2 - γ_4 - ϵ - α_2 - 3', indicando con trazo discontinuo los segmentos de DNA de estructura desconocida (Flanagan y Rabbits, 1982). El pseudogen γ no se ha localizado y el pseudogen ϵ_2 es un gen procesado (pseudogen generado a partir de la secuencia de un gen funcional vía un RNA intermedio) presente en otro cromosoma (Batley y col., 1982).

Mientras el dominio constante de las cadenas ligeras es codificado por un único exón (Max y col., 1981), los genes

de regiones constantes de cadenas pesadas constan de 3 (α y δ) o 4 (γ , ϵ y μ), correspondientes a cada uno de los dominios de homología, así como a la región gozne (zona característica entre los dominios C_{H1} y C_{H2} de algunas clases de inmunoglobulinas, figuras I.2. y I.3.). Excepcionalmente el gozne de C_α está incluido en el exón del dominio $C_\alpha 2$ (Honjo, 1983). Además, a 2-3 Kpb del extremo 3' de los exones que codifican el dominio con el grupo carboxilo terminal de las inmunoglobulinas circulantes, se encuentran dos exones M1 y M2 que codifican, respectivamente, los segmentos hidrofóbico e intracitoplasmático de las inmunoglobulinas de membrana (Yamawaki-Kataoka y col., 1982).

I.4.2.3. Genes de inmunoglobulinas activos.

La expresión de los genes de inmunoglobulinas está asociada al proceso de diferenciación de linfocitos y precisa de la recombinación somática de algunos segmentos de genes de la que resulta, en la célula productora de inmunoglobulinas, de configuraciones génicas distintas de la descrita en el apartado anterior, correspondiente a la configuración germinal. Además, ocurren otros fenómenos como la exclusión alélica e isotípica, el cambio de clase de inmunoglobulina sintetizada y la mutación somática, que se describen en el apartado I.4.6.

Un gen de cadenas ligeras activo se forma al unirse

uno de los segmentos V_L con cualquiera de los segmentos J_L , con la delección del DNA intermedio (Max y col., 1979). Para las cadenas pesadas, un segmento D se une a uno de los segmentos J_H y a ellos se une uno de los segmentos V_H , con la delección de las secuencias intermedias, figura I.3. (Early y col., 1980).

En estos procesos de recombinación somática parecen intervenir cortas secuencias de los bordes de los distintos segmentos V, D y J, que por su estructura pueden constituir señales de recombinación en la molécula de DNA (Early y col. 1980).

Buena parte de la diversidad expresada por los dominios V está relacionada con estos eventos recombinacionales, en primer lugar por la asociación aleatoria de segmentos, y en segundo, por la flexibilidad del proceso en cuanto al sitio preciso de recombinación (Tonegawa, 1983).

Aún se produce otra recombinación en la formación de genes activos de cadenas pesadas, cuando en la diferenciación del linfocito se produce un cambio en el tipo de cadena pesada sintetizada y que ocurre, al menos una vez, cuando el linfocito se convierte en plasmocito secretor de inmunoglobulinas (apartado I.4.6.; figura I.5.). Este nuevo tipo de recombinación tiene lugar entre regiones situadas a 1-4 Kpb del extremo 5' de los genes C_H (excepto del C_{δ}) que

contienen secuencias de nucleótidos relacionadas repetidas en tandem, de estructura generalmente conservada, conocidas como regiones S, figura I.3. (Ravetch y col., 1980). En este proceso, recombinación S-S, el gen V, producido en la recombinación V-D-J, es llevado al extremo 5' del gen C_H que va a expresarse, con la delección del DNA intermedio (Kataoka y col., 1980). Esta delección, como las que ocurren en la generación de genes V activos se explican según dos modelos: uno postula que esa región de DNA forma un bucle expuesto que es escindido y el otro está basado en un sobre-cruzamiento desigual entre cromátidas hermanas (Honjo, 1983).

I.4.3. Variantes de inmunoglobulinas.

La heterogeneidad de las inmunoglobulinas puede sistematizarse, de manera que las distintas moléculas queden comprendidas en alguna de las categorías o variantes asociadas a características estructurales definidas, si bien la discriminación entre ellas se ha venido haciendo serológicamente, por las diferencias antigénicas determinadas por esas estructuras. Cada una de estas variantes suele estar incluida en otra más general, y así, mientras ciertas variantes incluyen una sola inmunoglobulina de un individuo, otras comprenden la mayoría de ellas.

Las categorías más amplias o presentes en todos los individuos de una especie se conocen como variantes

isotípicas, y son las clases y subclases de inmunoglobulinas, o los tipos y subtipos de cadenas L que se han citado (apartado I.4.1.), de acuerdo con la existencia de otros tantos genes estructurales para los dominios C_H y C_L . Otras variantes isotípicas son las relativas a las regiones variables. Hay tres grupos de regiones variables, V_H , V_λ y V_κ , definidos por genes V de tres grupos de ligamiento distintos, y dentro de cada uno, subgrupos, establecidos a partir de las secuencias de regiones variables, que en humanos corresponden a $V_\kappa I-V_\kappa V$, $V_\lambda I-V_\lambda VI$ y $V_H I-V_H IV$ (Wang, 1978), asociados, probablemente a las distintas familias de genes V relacionados (Cory y col., 1981).

Las formas alélicas de los distintos genes de inmunoglobulinas determinan las variantes alotípicas que se presentan en las inmunoglobulinas de algunos individuos de la especie, pero no en las de todos. En humanos se encuentran tres grandes grupos de alotipos, Gm, Am y Km, asociados a alelos de genes C_γ , C_α y C_κ , respectivamente, pudiendo ocurrir que cualquiera de estos alelos lleve más de un alotipo (Natvig y Turner, 1971).

Las variantes alotípicas están incluidas en la isotípica más general: cualquiera de los alotipos Gm es además un isotipo γ , por ejemplo. Finalmente, se hallan las formas de inmunoglobulinas presentes en uno o pocos individuos, correspondientes a las variantes idiotípicas.

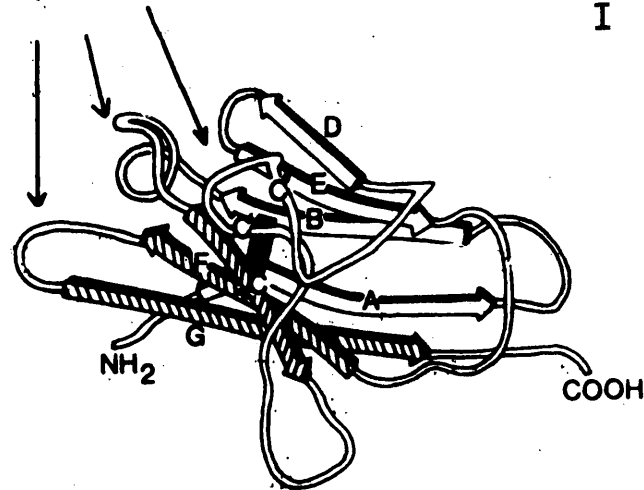
Cada uno de los idiotipos es producido por escasos clones celulares, uno solo incluso, aunque no siempre se encuentran asociados a la expresión de un sitio combinatorio particular (Hiernaux y Bona, 1982; Kohno y col., 1982). El idiotipo manifestado depende del gen variable expresado, de modo que individuos genéticamente relacionados pueden compartirlo, por ejemplo en la respuesta a un mismo antígeno, caso de los idiotipos públicos (Siekewitz y col., 1982) o, por el contrario, como los idiotipos privados, encontrarse en inmunoglobulinas individualizadas. En algún caso se han podido asociar estructuras de las regiones V con los determinantes idiotípicos, como en los anticuerpos de ratón anti-dextranos, en los que los idiotipos privados parecen localizarse en sitios definidos por el segmento D y los públicos en secuencias determinadas por el segmento V (Clevinger y col., 1980).

I.4.4. Estructura tridimensional de inmunoglobulinas.

La aplicación de la metodología empleada en la cristalografía de rayos X al estudio de la estructura de las moléculas de inmunoglobulina permitió obtener mapas de distribución de densidad electrónica en el cristal de la proteína considerada, a partir de su patrón de difracción de rayos X, los cuales, en condiciones favorables, alcanzan resoluciones de hasta 2 \AA , casos en los que si se conoce la

Regiones
Hipervariables

I



II

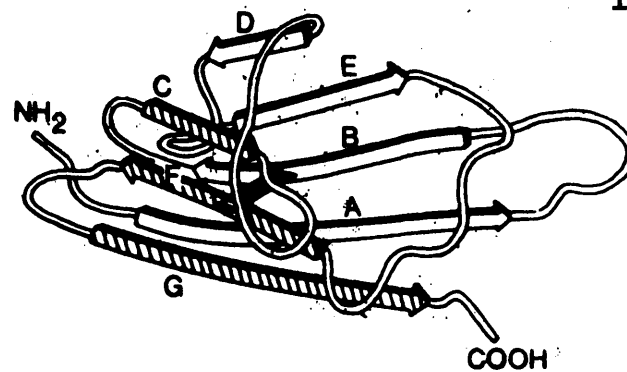


Figura I.4. Pliegue de la cadena polipeptídica de los dominios variable (I) y constante (II). El esquema muestra los segmentos antiparalelos de las dos láminas β , con el puente disulfuro que las une (barra negra), que constituyen cada uno de los dominios. El orden de los segmentos en la secuencia de aminoácidos se corresponde con el alfabético de las letras con que se designan, indicando con C' y C'' los segmentos adicionales del dominio variable. Reproducido de Jensenius y Williams, 1982.

secuencia de aminoácidos de la proteína, puede deducirse su estructura atómica (Poljak y col., 1976).

Los resultados obtenidos con fragmentos o moléculas enteras de inmunoglobulinas, sobre todo IgG, muestran que sus cadenas polipeptídicas aparecen plegadas espacialmente en estructuras compactas independientes, correspondientes a los distintos dominios de homología, unidas por tramos lineales. Asimismo, la conformación de cada una de ellas comparte un patrón característico, denominado pliegue de inmunoglobulinas (Schiffer y col., 1973; Poljak y col., 1973), constituido por dos láminas beta antiparalelas, una de 4 segmentos y la otra de 3, que delimitan un volumen densamente ocupado por cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos, unidas por un puente disulfuro en dirección perpendicular a los planos definidos por ambas láminas, figura I.4. Aproximadamente, la mitad de los aminoácidos del dominio constituyen los segmentos de las láminas antiparalelas, en tanto que el resto, en configuraciones variables, forma los codos y lazos de conexión de esos segmentos.

Aunque todos los dominios presentan un aspecto conformacional extraordinariamente similar, los de regiones variables tienen dos bucles más, correspondientes a la mayor longitud de su cadena polipeptídica, dispuestos en la lámina equivalente de 3 segmentos de los dominios constantes (Poljak y col., 1973).

Las interacciones no covalentes contribuyen decisivamente a la estabilidad conformacional de las inmunoglobulinas, como demuestra el que las cadenas H y L de una inmunoglobulina reducida no se disocian si no es en presencia de agentes desnaturalizantes (Fleischmann y col., 1961). Estas interacciones no covalentes pueden tener lugar entre dominios adyacentes del mismo o de distinto polipéptido, denominándose interacciones *cis* y *trans*, respectivamente.

Los distintos dominios de homología, excepto el C_H2 , aparecen asociados en parejas, a través de interacciones *trans*, formando módulos V_H-V_L , C_H1-C_L y C_H3-C_H3 , figura I.2., con extensas áreas de contacto entre ellos. Esta asociación de pares de dominios es de dos tipos. En uno de ellos, observado en dominios variables, se produce a través de la lámina de 5 segmentos de ambos dominios, incluyendo aminoácidos de las regiones más invariantes y de las regiones hipervariables (Poljak y col., 1973). En el otro tipo de asociación, el contacto ocurre por las caras de 4 segmentos de ambas láminas antiparalelas, y se observa en los pares C_L-C_H1 y C_H3-C_H3 (Poljak y col., 1973; Hubber y col., 1976). Los aminoácidos de las áreas de contacto implicados en estas asociaciones de dominios, son invariantes o están conservados en las inmunoglobulinas de distintos animales (Poljak y col., 1973; Saul y col., 1978).

Los dominios C_H2 de cada cadena no interaccionan

entre sí, sin embargo, muchos de los aminoácidos situados en posiciones equivalentes a aquellas a través de las que se produce la asociación de dominios, interaccionan con las cadenas ramificadas de oligoscárido anclado en esos dominios, las cuales cubren un área hidrófoba que de otro modo estaría expuesta al solvente (Marquart y Deisenhofer, 1982).

En las interacciones longitudinales entre dominios consecutivos, interacciones cis, intervienen un número reducido de contactos, generalmente a través de los segmentos de cadena polipeptídica no incluidos en las láminas beta, y por su debilidad permiten cambios conformacionales de la molécula que determinan la forma de flexibilidad molecular conocida como flexibilidad intrasegmental (Amzel y Polajk, 1979; Wrigley y col., 1983).

En los modelos tridimensionales de complejos antígeno-anticuerpo, se observa el contacto por enlaces de hidrógeno, electrostáticos y de Van der Waals, de los grupos químicos del determinante antigénico o epitopo, con los de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (Amzel y col., 1974; Segal y col., 1974), dispuestas en codos o bucles espacialmente próximos de los que conectan los segmentos de las láminas beta, definiendo cavidades o grietas en un extremo del par V_H-V_L o sitios activos anticor-pales. De este modo, cambios en el tamaño de las regiones determinantes de complementariedad, o sustituciones en los

aminoácidos que las constituyen, definen las distintas especificidades de un anticuerpo, manteniéndose la estructura tridimensional del dominio gracias a la configuración de los segmentos de secuencia más invariante, conocidos como regiones "framework" (Wu y Kabat, 1970), que constituyen el armazón sobre el que se disponen gran número de sitios combinatorios diferentes.

I.4.5. Fragmentos de inmunoglobulinas.

La obtención de fragmentos de inmunoglobulinas ha contribuido al establecimiento de la estructura general de su molécula (Porter, 1959), así como a facilitar la determinación de su secuencia de aminoácidos.

Estos fragmentos, preparados comúnmente por proteólisis controlada, contienen grupos de dominios adyacentes, con actividad biológica propia y que definen regiones características en la molécula de inmunoglobulina, cuya nomenclatura, además, se utiliza cada vez que hay que designar un área topográfica dada de su molécula.

El patrón de proteólisis está determinado fundamentalmente por la organización estructural de la inmunoglobulina en dominios, pues los puntos susceptibles de hidrólisis suelen encontrarse en los segmentos interdominios.

Los fragmentos capitales, denominados Fab y Fc,

son fragmentos excluyentes que contienen, respectivamente, la región de la molécula de inmunoglobulina con los sitios combinatorios y los dominios constantes del extremo C-terminal de las cadenas pesadas. La casi totalidad de los otros fragmentos descritos son polímeros o subfragmentos de éstos (tabla I.4.).

Fab, de fragmento que une antígeno, y Fc, de fragmento cristalizable (Porter, 1959), resultan de la proteólisis de la inmunoglobulina en su región gozne, o zona de estructura relativamente rígida por su contenido en prolina, con los puentes disulfuro entre cadenas pesadas y que puede contemplarse como la intersección de los brazos de una letra T, como figura asimilable a la forma de una inmunoglobulina, cuyo tramo horizontal constituye dos fragmentos Fab, y el vertical el fragmento Fc (figura I.2.). En torno a esta región se articula la flexibilidad segmental característica del movimiento independiente de los Fab entre sí y del Fc (Marquart y Deisenhofer, 1982). En las inmunoglobulinas sin región gozne estos fragmentos se producen por hidrólisis también en posiciones equivalentes de los dominios C_H2 .

En la tabla I.4. se muestran los fragmentos habitualmente utilizados, con su composición y notación terminológica.

Tabla I.4. FRAGMENTOS DE INMUNOGLOBULINAS

Fragmento	Dominios	Enzimas
Fab	V_H-C_H1 y L	papaína(1), tripsina (2,3)
$F(ab')_2$	$(V_H-C_H1-$ gozne y L) $_2$	pepsina (4,5,6)
Fv	V_H y V_L	pepsina (7)
Fc	C_H2-C_H3	papaína (IgG)(1), proteasa de <i>S. sanguis</i> (IgA1) (8)
$(Fc)_{5\mu}$	$(C_{\mu}3-C_{\mu}4)_5$	tripsina (2)
Facb γ	$(\gamma$ sin $C\gamma 3$ y L) $_2$	plasmina (9)
pFc' γ	$C\gamma 3$	pepsina (4)
Fd	V_H-C_H1	reducción de Fab
Fab'	V_H-C_H1- "hinge" y L	reducción de $F(ab')_2$

Fragmentos de inmunoglobulinas que resultan en su digestión controlada con enzimas proteolíticos.

Se muestra la estructura de dominios de los más usuales, indicándose su referencia y el enzima que los produce.

Referencias: 1, Porter, 1959; 2, Plaut y Tomassi, 1970; 3, Waller y col., 1969; 4, Nisonoff y col., 1960; 5, Kishimoto y col., 1968; 6, Wilson y Williams, 1969; 7, Lin y Putnam, 1978; 8, Plaut y col., 1974; 9, Connell y Porter, 1971.

I.4.6. Producción de inmunoglobulinas en la diferenciación del linfocito.

Antes de su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos, los linfocitos B atraviesan estadios celulares en los que la organización de los genes de cadenas H y L, el tipo de cadenas expresadas y los niveles de expresión de esos genes son distintos (figura I.5.).

Así, las células pluripotenciales hematopoyéticas generan un tipo celular de línea linfoide que deriva en un linfocito pre-B, paso en el que se produce un gen μ activo, así como la expresión de cadenas μ en el citoplasma, sin expresión de cadenas L (Siden y col., 1979). Células pre-B tardías, con sus genes L activos pero no transcritos, se convierten en células B inmaduras que expresan cadenas L y exponen IgM en su superficie. En el siguiente estadio hay expresión de IgM e IgD, con idénticos sitios combinatorios, como receptores de antígeno, en la superficie del linfocito B (Coffman y Cohn, 1977).

La ulterior diferenciación del linfocito B requiere su activación por mitógenos o antígeno, así como otros grupos celulares del sistema inmune, linfocitos T y macrófagos y sus productos (Melchers y col., 1980). El linfocito B activado secreta IgM y madura a una célula plasmática productora de anticuerpos IgM o IgA o IgG o IgE, sin inmuno-

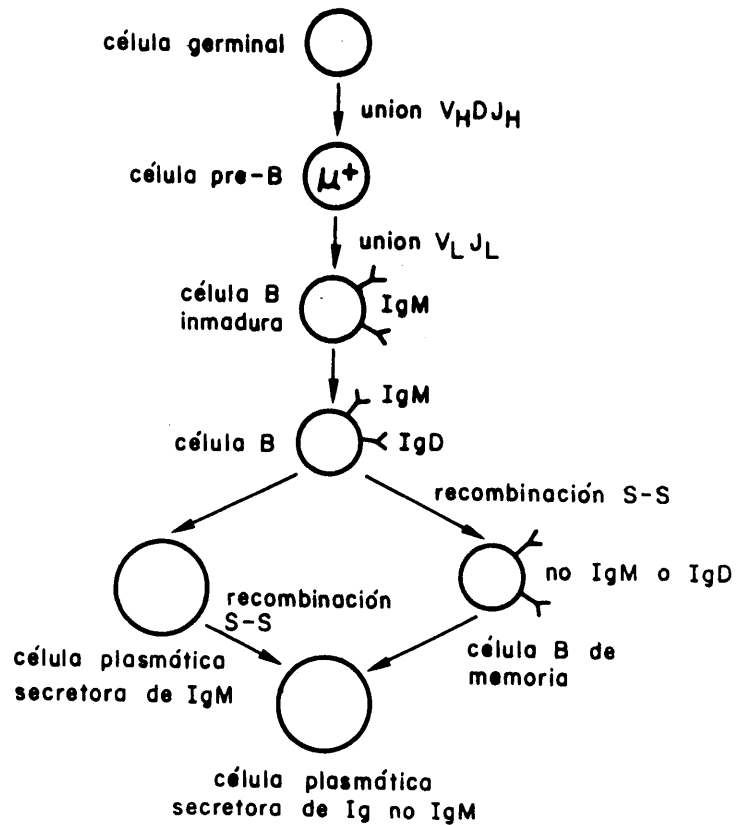


Figura I.5. Esquema simplificado de la diferenciación de linfocitos B, mostrando las translocaciones de genes asociadas a la expresión de inmunoglobulinas en superficie (Y) o su secreción en los tipos celulares indicados. Modificado de Wall y Kuehl, 1983.

· globulinas en su superficie, o da lugar a una célula B de memoria, con inmunoglobulinas en membrana de otro tipo que IgM o IgD, y que por estimulación antigénica da lugar también a una célula plasmática, figura I.5. (McKenzie y Potter, 1979).

En esta expansión clonal conducida por antígeno, se fijan las mutaciones somáticas que pueden producirse sólo después de la recombinación de segmentos de los genes V (Gearhart y Bogenhagen, 1983) y que da lugar a los anticuerpos sin la restricción de afinidad por el antígeno que muestran aquellos con sitios combinatorios definidos por genes V primarios de la línea germinal (Rodwell y col., 1983).

A lo largo de este proceso se expresa uno solo de los alelos, materno o paterno, de los genes activos para H y L, fenómeno conocido como exclusión alélica, que junto con la expresión de uno solo de los genes C_L , λ o κ , fenómeno de exclusión isotípica, determina que cada célula B produzca inmunoglobulinas con un sitio combinatorio único (Wall y Khuel, 1983).

La activa expresión de genes H y L, tras la recombinación de los segmentos correspondientes a sus regiones variables, está controlada por secuencias "enhancer" localizadas en el intrón que separa los genes J_H y la región S del gen C_μ , figura I.3. (Barneji y col., 1983), y en po-

siciones equivalentes de genes C_L (Queen y Baltimore, 1983), que tienen la propiedad de estimular singularmente la tasa transcripcional de genes en su área de influencia (Banerji y col, 1981). La activación de estas secuencias "enhancer" en el proceso recombinacional que produce los genes activos puede explicar la regulación de su expresión si se tiene en cuenta que la secuencia 5' del segmento V, con todos los elementos de los promotores de transcripción, se mantiene inalterada en el mismo (Clark y col., 1982).

Los genes de cadenas ligeras codifican un único mRNA y contienen un solo sitio de adición de poli(A) (Perry, 1981), pero los de cadenas pesadas contienen al menos dos, constituyendo unidades transcripcionales complejas, capaces de producir dos mRNA, figura I.3.. Estos sitios se encuentran al final del último exón C_H o al final del último exón de membrana, de modo que la poliadenilación de uno u otro en el RNA transcrito (en un proceso acompañado de la escisión del RNA que sigue), da lugar a mensajeros de cadenas pesadas secretadas o de membrana, respectivamente (Rogers y col., 1980).

Tras el procesamiento de estos mensajeros en el núcleo celular, reuniendo todos los exones en una secuencia continua, tras la escisión de los distintos intrones, figura I.3., los RNA de cadenas H y L resultantes son traducidos.

Su localización en el retículo endoplasmático rugoso, así como la translocación de las cadenas H y L a las cisternas, parece determinada por las secuencias de señal, situadas en su extremo N-terminal y que son removidas antes de la conclusión de la cadena polipeptídica y su liberación del ribosoma (Blowell y Bobberstein, 1975).

Las cadenas H y L van adoptando su pliegue intramolecular conforme se sintetizan y una vez completadas se ensamblan (también con las cadenas J si son inmunoglobulinas poliméricas, apartado I.4.8.1.) y en el aparato de Golgi son glicosiladas antes de su exposición en membrana o secrección al exterior celular (Wall y Kuehl, 1983).

I.4.7. Relaciones evolutivas de inmunoglobulinas.

La información estructural disponible sobre inmunoglobulinas de vertebrados inferiores se ajusta esencialmente a los criterios deducidos de las mejor estudiadas de mamíferos, siendo muy probable que compartan un mismo origen evolutivo (Putnam, 1977b).

La construcción de cadenas H y L sobre un patrón estructural recurrente de similar disposición tridimensional, apunta a un gen primordial codificante para el equivalente de un dominio de 110-120 aminoácidos como el precursor de los sistemas de genes de inmunoglobulinas (Hill y col., 1966).

Al parecer, ese origen evolutivo es común, además, a otras proteínas con estructuras relacionadas con las de inmunoglobulinas, como los antígenos de clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad, la β_2 -microglobulina asociada a la cadena pesada de los antígenos de clase I, o antígenos de diferenciación como el Thy-1 (Jensenius y Williams, 1982).

De este modo, la duplicación y ulterior diversificación de ese gen ancestral, habría dado lugar a los sistemas codificantes para este conjunto de proteínas relacionadas, después de seguir evoluciones diferenciadas, como en el caso de los genes de regiones V y regiones C.

No obstante, la historia evolutiva de las inmunoglobulinas, como corresponde a una familia multigénica, no puede interpretarse sólo a partir de sucesivas duplicaciones y la acumulación de mutaciones en una evolución independiente para cada miembro de esa familia, que no explicaría la mayor divergencia de la región gozne (Ellison y Hood, 1982), o las diferentes homologías de los distintos dominios constantes de cada cadena pesada (Low y col., 1976; Miyata y col., 1980).

Asimismo, el que familias de genes muy expandidas, como son las de las regiones variables, acumulen variaciones de modo que el dominio codificado no modifique su estruc-

tura, sugiere la existencia de mecanismos que prevengan la libre diversificación de los distintos genes durante su evolución.

Se conocen dos mecanismos de corrección génica que actúan sobre familias de genes dispuestos en tandem: la conversión génica y el doble sobrecruzamiento desigual (Baltimore, 1981), y de ambos hay evidencia experimental de su probable participación en la historia evolutiva de los genes de inmunoglobulinas (Bentley y Rabbits, 1983; Miyata y col., 1980).

Mientras que en la conversión génica un pequeño segmento de un gen es reemplazado por otro de un gen homólogo, sin variación en el tamaño de las correspondientes familias de genes, en el doble sobrecruzamiento desigual, resulta recíprocamente alterado el tamaño de las familias afectadas (Baltimore, 1981).

De hecho se ha sugerido que las regiones de homología de las inmunoglobulinas, se deben no tanto a la presión evolutiva sobre la secuencia de nucleótidos de los distintos genes, sino al mecanismo de corrección que opera sobre ellos (Miyata y col., 1980), de modo que las regiones de homología consistirían en los correspondientes exones y las secuencias intermedias adyacentes, tal como se deduce

de la probable transferencia de dominios entre distintos genes, a nivel de secuencias intermedias en los dominios C_H1 y de regiones γ en genes γ humanos (Takahashi y col., 1982b) y de ratón (Miyata y col., 1980) o de exones de membrana de genes γ de ratón (Yamawaki-Kataoka y col., 1982).

Los genes V_H muestran, asimismo, homologías segmentales de diversa longitud (Ollo y col., 1983), sugiriendo el intercambio de bloques de secuencias entre genes, con la actuación de mecanismos de corrección génica. Paradójicamente, estos mecanismos, al tiempo que contribuyen al polimorfismo de la familia multigénica interesada, construyendo distintas combinaciones entre elementos de su repertorio, mantienen su homogeneidad, así como la funcionalidad de sus secuencias, de las que las correspondientes a las regiones "framework" se hallan sometidas a mayor presión evolutiva a nivel de proteína, de acuerdo con la mayor tasa de sustituciones observada en las propias de CDR1 y CDR2 (Givol y col., 1981; Loh y col., 1983).

Los genes V_H tienen en sus bordes 5' y 3' secuencias que pueden determinar estructuras que los hacen elementos potencialmente transponibles (Rechavi y col., 1983) lo que podría facilitar la amplificación de las familias de genes, algunos de cuyos miembros ancestrales divergieron incluso

antes de la diversificación de los mamíferos (Kataoka y col., 1982), lo que permite comprender el alto grado de homología entre genes V_H de grupos de vertebrados evolutivamente alejados, como aves, reptiles y mamíferos (Litman y col., 1982).

Esta preservación de homología, que comprende no sólo exones sino regiones no codificantes, es tal que la relación entre genes del mismo subgrupo V_H de diferentes especies es mayor que la observada entre genes de distinto subgrupo en una misma especie (Rechavi y col., 1983).

I.4.8. Las clases de inmunoglobulinas humanas.

I.4.8.1. Inmunoglobulinas M.

Constituyen el 5-10% de las inmunoglobulinas del suero. Son macroglobulinas de alto peso molecular, 900000, debido a su estructura pentamérica de subunidades de dos cadenas ligeras y dos cadenas μ (Miller y Metzger, 1965).

Su cadena pesada carece de región gozne y su región constante tiene 4 dominios de homología, sobre los que se disponen 5 oligosacáridos (tabla I.5.), que comprenden el 12% en peso de la molécula. Posee, además, un corto segmento en su extremo C-terminal, al que se encuentra unida una pequeña glicoproteína de 15000 de peso molecular, denominada cadena J, cuya síntesis es activada en la diferen-

Tabla I.5. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE INMUNOGLOBULINAS HUMANAS

Cadena	Clase	M_r	C	Puentes inter H	gozne	Oligosacárido
μ	IgM	$900000(\mu_2L_2)_5$	4	2	-	5Glc
α	IgA (IgA1, IgA2)	$150000(\alpha_2L_2)$	3	2	+ IgA2 corto	IgA1: 2Glc, 5Gal IgA2: 4Glc(A2m(1)) 5Glc(A2m(2))
γ	IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)	$150000(\gamma_2L_2)$	3	$2(\gamma_1)$ $11(\gamma_3)$ $4(\gamma_2, \gamma_4)$	+ IgG3 largo	1Glc
ϵ	IgE	$190000(\epsilon_2L_2)$	4	2	-	6Glc
δ	IgD	$175000(\delta_2L_2)$	3	1	+ largo	4Glc, 4Gal

Junto al peso molecular (M_r) se muestra la composición polipeptídica de cada clase de inmunoglobulina. C, es el número de dominios constantes. Puentes inter H indica el número de puentes disulfuro que unen cadenas pesadas en un monómero. La presencia o ausencia de gozne se señala por + y -, respectivamente. En el contenido de oligosacáridos de la IgA2 se ha diferenciado el de sus dos formas alotípicas, entre paréntesis. Glc y Gal, representan oligosacáridos de glucosamina y galactosamina.

Referencias: Eisen y col., 1980a; Putnam, 1977a; Toraño y col., 1977; Toraño y Putnam, 1978; Takahashi y col., 1983.

ciación del linfocito a célula plasmática, donde puede constituir un núcleo de polimerización sobre el que se organiza la forma pentamérica de la IgM secretada (Raschke y col., 1979).

Las subunidades de la IgM se disponen radialmente, con sus regiones Fab en la periferia de un disco plano, el fragmento $(Fc)_5\mu$, constituido por los dominios $C\mu 3$ y $C\mu 4$ de cada una de ellas, unidos por puentes disulfuro, y una molécula de cadena J, característica de las inmunoglobulinas poliméricas, también unida por puentes disulfuro a una de las subunidades.

A diferencia de lo que ocurre en inmunoglobulinas de otras clases, los dominios de la región Fc de cada subunidad presentan interacciones no covalentes débiles (Hester y col., 1975). Aunque carece de región gozne, la IgM muestra flexibilidad segmental, que resulta afectada por cambios conformacionales en sus dominios $C\mu 2$ (Holowka y Cathou, 1976; Segel y Cathou, 1981), y que hace posible la extraordinaria libertad de movimientos de sus regiones Fab μ observada en micrografías electrónicas (Feinstein y col., 1971).

Quizá su naturaleza polimérica sea la propiedad funcionalmente más destacable, ya que con sitios anticorpa-
les de baja afinidad por el antígeno, en general (Karush, 1978),

muestra una eficaz interacción con él, siendo, por ejemplo, el anticuerpo típicamente aglutinante de microorganismos. No obstante, las moléculas de IgM presentan cierta heterogeneidad en cuanto al número de sitios de unión de antígeno activos, de modo que los calculados experimentalmente a veces no coincide con los 10 teóricos, máximos (Giles y col., 1983). La activación del sistema del complemento por la unión de su elemento C1q es, asimismo, más eficaz que la producida por inmunoglobulinas monoméricas, a no ser que se hallen agregadas en inmunocomplejos (Jaton, 1976).

De acuerdo con esto, los dominios interesados en la polimerización de las inmunoglobulinas poliméricas, C μ 4 y C α 3, son los que muestran una mayor homología, un 50%, de entre los dominios C H humanos (Low y col., 1976). Además, también son idénticas el 78% de las posiciones de las regiones equivalentes de IgM e IgA de ratón (Cann y col., 1982). Por su parte, la homología de los dominios de las cadenas J humana y de ratón a través del que se unen a las cadenas α y μ , es del 75% (Cann y col., 1982), todo lo cual sugiere que las estructuras implicadas en la polimerización son de los elementos más conservados en las moléculas de inmunoglobulina.

I.4.8.2. Inmunoglobulinas A.

Las inmunoglobulinas de esta clase son los anti-

cuerpos más abundantes en las secrecciones de las glándulas exocrinas, aunque también se encuentran en el suero, constituyendo alrededor del 15% de las inmunoglobulinas.

Gran parte de la IgA de suero es un monómero de dos cadenas ligeras y dos cadenas α , de 150000 de peso molecular, pero también aparece como dímeros y trímeros de esa subunidad (tabla I.5.).

Hay dos cadenas α que corresponden a las subclases IgA1 e IgA2, con 3 dominios de homología en sus regiones constantes y una región gozne, que en las α_2 tiene 13 aminoácidos menos (Toraño y Putnam, 1978) y por ello carece de 5 cortos sacáridos característicos, unidos O-glicosídicamente en esa región, aunque su contenido en oligosacáridos unidos O-glicosídicamente es mayor (Toraño y col., 1977). La mayoría de las IgA2 son de una forma alotípica, IgA2m(1), en la que las cadenas ligeras y pesadas se encuentran asociadas de modo no covalente (Toraño y Putnam, 1978).

En las secrecciones exocrinas la abundancia de ambas subclases de IgA es similar, a diferencia de lo que ocurre en suero, donde el 85% es IgA1. La IgA exocrina está constituida por dos subunidades de IgA monomérica y una molécula de cadena J, unida por puentes disulfuro al corto segmento del extremo C-terminal, a una de las cadenas α

de cada subunidad (García Pardo y col., 1981), como en las formas poliméricas de suero. Contiene además, característicamente, una glicoproteína de 71000 de peso molecular, unida por dos puentes disulfuro a la cadena pesada de una de las dos subunidades (García Pardo y col., 1979), denominada pieza secretoria, por su papel en el transporte de la IgA hacia la luz de las vías de secreción. (Brandtzaeg, 1981).

I.4.8.3. Inmunoglobulinas G.

La IgG constituye el 80% de las inmunoglobulinas del suero. Su peso molecular de 150000 se corresponde con la estructura de dos cadenas ligeras y dos cadenas γ . El 3% en peso de la molécula se debe al único oligosacárido de sus cadenas pesadas (tabla I.5.).

Hay 4 tipos de cadenas γ , todas con 3 dominios de homología en sus regiones constantes, que determinan las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, con diferencias localizadas, fundamentalmente, en sus regiones gozne (tabla I.5.), de las que resultan, por ejemplo, distintas susceptibilidades a la proteólisis (Turner y col., 1970; Virella y Parkhouse, 1971). Así, mientras la longitud de la región gozne de IgG1, IgG2 e IgG4 es similar, la de IgG3 es mayor, por repetición de la correspondiente secuencia (Michaelson y col., 1977).

La unión entre las cadenas pesadas se produce a través de puentes disulfuro en la región gozne, en número variable según la subclase de que se trate (tabla I.5.). Asimismo, en la IgG1 la cadena ligera se une al final del dominio C_{H1} , en vez de al principio del mismo, como ocurre en las otras subclases (DePreval y col., 1970).

Por otro lado la abundancia relativa de cada una de las subclases en suero es también distinta: 60 % IgG1, 30 %, IgG2, 7 %, IgG3 y 3 %, IgG4 (Eisen, 1980a), y de acuerdo con las estructuras propias de sus cadenas pesadas muestran actividades biológicas diferenciadas, tales como la unión a receptores de IgG en la superficie de células efectoras del sistema inmune (Winkelhake 1978), o en la capacidad de activación del sistema del complemento (Brunhouse y Cebra, 1978).

I.4.8.4. Inmunoglobulinas E.

Las inmunoglobulinas de esta clase se encuentran en la superficie de leucocitos basófilos y mastocitos, unidas a receptores de estas células específicos de IgE (Spiegelberg, 1983), y en muy pequeñas cantidades en suero.

Su cadena pesada, con 4 dominios de homología en su región constante, y sin región gozne. (Bennich y von Bahr-Lindstrom, 1974), tiene 5 oligosacáridos, lo que

en conjunto determina el alto peso molecular de estas inmunoglobulinas, constituidas por monómeros de dos cadenas ligeras y dos cadenas ϵ (tabla I.5.).

La IgE media característicamente las reacciones de hipersensibilidad inmediata, producidas por las sustancias liberadas desde las células donde se encuentran unidas, tras la agregación de los receptores de IgE que sigue a la unión de su antígeno (Segal y col., 1977).

I.4.8.5. Inmunoglobulinas D.

La IgD se encuentra en muy bajas concentraciones en suero, un 0.2% de las inmunoglobulinas, y está constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas δ , con un peso molecular de 175000 (tabla I.5.).

La cadena δ tiene 3 dominios de homología en su región constante, y una larga región gozne (Lin y Putnam, 1977), con 4-5 oligosacáridos cortos, unidos O-glicosídicamente, que con los 3 oligosacáridos complejos de otras regiones de la cadena pesada, determinan así un peso molecular para la IgD intermedio entre los de las formas monoméricas de inmunoglobulinas con 3 o con 4 dominios C_H .

Las inmunoglobulinas de esta clase son las únicas cuyas cadenas pesadas se hallan unidas por un único puente

disulfuro, en la región gózne (Lin y Putnam, 1979). Asimismo, en tanto las cadenas ligeras humanas se encuentran asociadas con las distintas cadenas pesadas en la proporción 70%κ, 30%λ (Putnam, 1977a), aproximadamente el 80% de las IgD llevan cadenas λ (Takahashi y col., 1983). Su actividad biológica, aparte la de receptor de antígeno de su forma de membrana (Rowe y col., 1973), es aún bastante desconocida.

I.5. INTERACCION PROTEINA A-INMUNOGLOBULINAS

Aunque las primeras manifestaciones de esta interacción, observadas en la precipitación en geles de agarosa de sueros de individuos humanos en presencia de extractos de cepas de *S. aureus* con proteína A, fueron atribuidas a la existencia en los sueros de anticuerpos contra componentes bacterianos (Jensen, 1958), las evidencias en contra de la participación de las inmunoglobulinas como anticuerpos en esta reacción, atraieron la atención de numerosos investigadores hacia el estudio de esta particular interacción.

I.5.1. Independencia de la función anticorpal.

Los métodos iniciales de estudio de la reactividad de PA con inmunoglobulinas, se han basado en el análisis de la formación de complejos precipitables, o su inhi-

bición, definiendo reactividades precipitante e inhibidora de precipitación, respectivamente (Kronvall y Williams, 1969).

Cuando por estos medios se observó que el 45% de la IgG de suero humano normal precipitaba en presencia de preparaciones de PA de la cepa Cowan I, y que esta reacción de precipitación ocurre también con proteínas IgG de mieloma distintas, se sospechó que se trataba de una reacción diferente de las de tipo antígeno-anticuerpo.

Por otra parte, los fragmentos Fab y Fc de IgG humana policlonal, no precipitan en agarosa con PA, pero mientras el Fab no es capaz de inhibir la reacción de precipitación de IgG y PA, el Fc sí (Forsgren y Sjoquist, 1966). Asimismo, fragmentos Fab de IgG de mieloma con actividad anti-estreptolisina O, no son absorbidos, a diferencia de la IgG entera, por organismos *S. aureus* con PA (Kronvall, 1967).

Todos estos resultados coinciden en señalar que en la interacción considerada no se hallan implicados los sitios combinatorios de las inmunoglobulinas, y que el receptor o receptores de PA han de hallarse en otro punto de sus moléculas.

I.5.2. Interacción con IgG a través de la región Fc γ .

Desde los primeros estudios, también, la reactividad de la IgG con PA fue asociada a estructuras de sus cadenas pesadas, pues éstas, a diferencia de las cadenas ligeras, conservan la capacidad de interacción con la PA e inhiben la reacción de precipitación con la molécula intacta (Forsgren y Sjoquist, 1966). Adicionalmente, de las distintas reactividades de varios fragmentos de IgG, apuntan a la localización del receptor de PA en la región Fc γ , ya que en tanto el Fab γ o el F(ab') $_2\gamma$ no son activos en la reacción de precipitación, el Fc γ , pero no subfragmentos, como el Fc' o el pFc, es capaz de dar reacciones de inhibición, aunque, sin embargo, por sí solo no forma complejos precipitables con PA (Kronvall y Frommel, 1970).

La reducción suave y alquilación del fragmento Fc γ (Kronvall y Frommel, 1970) o la proteólisis del mismo con tripsina, después de su desnaturalización parcial con pH ácido (Endresen y Grov, 1976), dan lugar a productos que conservan la reactividad con PA, con la común característica de tener intacta al menos una de sus cadenas (Endresen y Grov, 1976). Estos resultados, junto con la ausencia de reactividad observada para el fragmento Facb γ (Lancet y col., 1978), sugieren que la estructura definida por los dominios C $_H2$ y C $_H3$, intactos y adyacentes, es imprescindible para la interacción del fragmento Fc γ con

la PA (Lancet y col., 1978).

Los fragmentos Fc de la IgG de otros mamíferos (cerdo, ratón, conejo, cobayo) precisan mantener, análogamente, los contactos intracadenas de sus dominios, lo que configura un receptor general de PA, en la región Fc de las moléculas de IgG, evolutivamente conservado, al menos en el grupo de vertebrados mamíferos (Kronvall y col., 1970a).

Estas conclusiones se han confirmado en el análisis de la estructura a nivel atómico de los cristales formados por el fragmento B de la proteína A (apartado I.3.2.3.) y la región Fc de IgG humana (Deisenhofer y col., 1978). De los dos tipos de contactos observados en estos cristales, el más probable en la interacción que ocurre en soluciones acuosas, parece ser uno de naturaleza hidrófoba, de 1234\AA^2 de superficie, en el que participan aminoácidos de los dominios C_H2 y C_H3 y de las dos hélices α en que se organiza buena parte de la cadena del fragmento B (Deisenhofer, 1981). De acuerdo con esto, además de la Ile253 del Fc γ , que se encuentra completamente cubierta por aminoácidos del fragmento B, los otros residuos del Fc γ implicados en la interacción son: Met252 y Ser254, Leu309, His310, Glu311 y Asn434, His435, Tyr436, que se hallan dispuestos muy próximos entre sí, en el área entre los dominios C_H2 y C_H3 (Deisenhofer y col., 1978).

Los estudios cristalográficos coinciden asimismo con los resultados obtenidos acerca del efecto de la modificación química selectiva de aminoácidos de la PA sobre su reactividad con IgG, los cuales han mostrado la importancia de las Tyr. Así, la secuencia Phe-Tyr-Glu, presente también en posiciones equivalente de los otros dominios de homología de la PA (Sjodahl, 1977a), es uno de los puntos de contacto de una hélice α del fragmento B con el Fc γ (Deisenhofer, 1981), y de acuerdo con el análisis de aminoácidos de la PA (Sjoquist y col., 1972a), debe ser la que resulta alterada en tratamientos con acetilimidazol (Sjoholm y col., 1972), tetranitrometano (Sjoholm y col., 1973) o yodación (Sjoholm y Sjodin, 1974), en los que se encuentran implicados residuos de Tyr, y que van acompañados de pérdida de reactividad de la PA.

Los estudios de modificación química de IgG, en cambio, sólo han podido identificar a la His como aminoácido esencial en la interacción con PA (Haake y col., 1982), probablemente la His⁴³⁵ del contacto observado en el cristal (Deisenhofer, 1978). En otras modificaciones menos selectivas, resultan pérdidas de actividad por acetilación o cambio de reactividad precipitante a inhibidora de precipitación por carbamilación (Kronvall y col., 1970d).

I.5.3. Reactividad de las subclases de IgG.

El estudio de la interacción con PA de distintas

-101-

IgG humanas de mieloma, muestra que las subclases 1, 2 y 4 son reactivas, tanto como precipitantes como inhibidoras de precipitación, mientras las IgG3 no presentan ninguna de las dos actividades (Kronvall y Williams, 1970).

Esta distinta reactividad de las subclases de IgG humana, es la base de un método de purificación de IgG3, que utiliza la cromatografía de afinidad con PA-Sepharose (Patrick y Virella, 1978). No obstante, entre el material de suero humano que es retenido en esta columna de afinidad, se ha detectado la presencia de parte de la IgG3 (Skvaril, 1976; Van Kamp, 1979). Esto puede estar relacionado con la existencia de proteínas IgG3 reactivas con PA, y que muestran cambios en la secuencia de su región Fc, particularmente la sustitución en las posiciones 435-436, que en estas proteínas es His-Tyr en lugar de la Arg-Tyr habitual (Recht y col., 1981), y que con otras, se encuentra en las variantes alotípicas G3m(u⁻) (VanLoghem y col., 1982). Son, pues, alelos γ_3 que codifican una secuencia en esa zona del dominio C_H3, idéntica a la de las subclases 1, 2 y 4 implicada en la interacción con PA.

También se ha apreciado reactividad diferencial en las subclases de IgG de otros mamíferos, principalmente referida a su distinto comportamiento en columnas de PA-Sepharose, debido a los esfuerzos dedicados a la búsque-

da de condiciones cromatográficas que permitan el aislamiento de subclases de IgG, no logrado por procedimientos convencionales.

Así, cuando el suero de ratón es cromatografiado en una columna de PA-Sepharose a pH 8.0, y el material retenido en el gel es eluido con tampones de acidez creciente, se observa la disociación secuencial de IgG1, IgG2a e IgG2b (Ey y col., 1978). La interacción de la IgG1 con la columna es muy débil, pues si la cromatografía se hace a pH 7.0, apenas es retenida. Estudios con proteínas de mieloma confirman estos resultados y extienden la reactividad a la IgG3 (Mackenzie y col., 1978b).

La interacción de la IgG de cabra con PA es débil, siendo en todo caso mayor la afinidad de la IgG2 que la de la IgG1, la cual sólo se une a columnas alargadas de PA-Sepharose de gran capacidad y a pH 9.1 (Delacroix y Vaerman, 1979). Son IgGs que no dan reacción de precipitación con PA, sino de inhibición (Kronvall y col., 1970a). La IgG1 e IgG2 de oveja muestran asimismo, un comportamiento similar al observado para las subclases 1 y 2 de cabra, respectivamente (Bennell y Wattson, 1980).

La IgG2a de rata no se fija a columnas de PA-Sepharose, y la IgG2b sólo en condiciones como las citadas para la IgG1 de cabra (Rousseaux y col., 1981). La IgG1 interac-

ciona también débilmente, como la IgG1 de ratón, y sólo la IgG2c es claramente retenida por la columna (Rousseaux y col. , 1981).

En cualquier caso, la separación de las distintas subclases por su interacción con PA dependiente de pH no es definida, y su utilidad como procedimiento de purificación de subclases de IgG, limitada (Ey y col., 1978; Delacroix y Vaerman, 1979; Chalon y col., 1979), ya que es una interacción que muestra heterogeneidad intraisotípica, como es el caso de la IgG1 e IgG2 de cobayo (Ricardo y col., 1981), ambas precipitantes, a diferencia de las IgG de ratón (Kronvall y col., 1970a), y que por elución de la columna de PA-Sepharose con tampones de distinto pH se separan en dos fracciones que contienen moléculas de ambas subclases (Ricardo y col., 1981). Este fenómeno se aprecia también con las IgG de otros roedores (Coe y col., 1981) y con proteínas de mieloma de rata (Rousseaux y col., 1981) y ratón (Mackenzie y col., 1978b). La IgG humana, que a pH neutro se une a PA-Sepharose, excepto la IgG3, puede resolverse, en determinadas condiciones, en un eluido que muestra una cierta separación de IgG2, que sale de la columna a pH algo menos ácido que la IgG1 (Duhamel y col., 1979).

I.5.4. Reactividad de otras clases de inmunoglobulinas con proteína A.

I.5.4.1. Inmunoglobulinas A.

La primera referencia de inmunoglobulinas no IgG reactivas con PA corresponde a proteínas IgA de calostro humano (McDowell y col., 1971). Sin embargo, esta reactividad no incluye a la totalidad de la IgA de calostro o de suero, ni la de las proteínas de mieloma (Grosv, 1976; Saltvedt y Harboe, 1976; Van Kamp, 1979).

A diferencia de la de IgG, la interacción de IgA con PA no puede apreciarse por medio de reacciones de precipitación directa en geles de agarosa, pero sí en modificaciones del método, que permiten la formación de complejos precipitables constituidos por la PA, la inmunoglobulina no precipitante y un tercer elemento, como fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos anti-PA, en lo que se denomina reacción de coprecipitación (Kronvall y Williams, 1971).

Estos complejos, cuando los reactantes difunden en el gel de agarosa desde dos puntos, forman una banda recta, pero cuando difunden desde tres pocillos dispuestos como vértices de un triángulo, el precipitado adopta una forma característica, constituida por tres líneas que, partiendo de cada pocillo, convergen dibujando una estrella de tres puntas, lo que dio a esta precipitación el término de fenó-

meno estrella (Kronvall y Williams, 1971; Grov y Endresen, 1976).

Aunque se llegó a asignar la reactividad de la IgA a moléculas de la subclase IgA2 (Saltvedt y Harboe, 1976), esta conclusión no se ha confirmado y, en realidad, no parece existir ninguna relación entre los isotipos de IgA y su capacidad de interacción con PA (Brunda y col., 1979; Van Kamp, 1979; Biewenga y col., 1982).

Sobre la estructura de la molécula de IgA implicada en la unión de PA, los resultados no son claros. Así, los fragmentos $F(ab')_2\alpha$, preparados a partir de IgA de calostro humano que se une a columnas de PA-Sepharose, no son retenidos por la misma columna, ni dan reacción de coprecipitación (Grov, 1976). Por otro lado, el fragmento $F(ab')_2\alpha$ no conserva la capacidad de unión de la IgA1 de mieloma de la que se obtuvo, para unirse a células de *S. aureus* con PA (Brunda y col., 1979). Estos son resultados que se han interpretado en base a la presencia en la región $Fc\alpha$ del sitio de interacción de la IgA con la PA. Sin embargo, también se han descrito proteínas IgA cuyos fragmentos $F(ab')_2\alpha$ son reactivos con PA, aunque no los Fab o Fab', apuntando la necesidad de la región gozne para esta interacción (Biewenga y col., 1982).

Con proteínas de mieloma no se ha podido establecer una relación entre grado de polimerización y reactividad con PA (Brunda y col., 1979) y las fracciones de IgA poli-

clonal de calostro o suero que interaccionan con PA son similares, en torno al 30% (Grosv, 1976; Van Kamp, 1979). Junto a la existencia de proteínas no reactivas, se encuentran IgA cuya afinidad por la PA parece incluso mayor que la de la IgG (Harboe y Folling, 1974), aunque ello debe ser excepcional, teniendo en cuenta que para la mayoría de las IgA monoclonales, sólo una pequeña parte de cada una es retenida en PA-Sepharose (Biewenga y col., 1982).

De otros mamíferos, la IgA policlonal de suero de cerdo, perro y gato, contiene fracciones reactivas con PA (Goudswaard y col., 1978), como la de cabra (Delacroix y Vaerman, 1979) y oveja (Bennell y Watson, 1980). También la IgA de calostro de cerdo y oveja es reactiva con PA (Bennell y Watson, 1980). A diferencia de lo observado con IgA humana, los fragmentos Fab_a de IgA policlonal de cerdo mantienen su capacidad de unión a PA-Sepharose (Zikan, 1980b).

I.5.4.2. Inmunoglobulinas M.

Al igual que con las IgA, la ausencia de reactividad de proteínas IgM de mieloma humano en ensayos de precipitación directa con PA en geles de agarosa, estableció para esta clase de inmunoglobulinas la condición de no reactivas con PA (Kronvall y col., 1970a), idea que se ha cambiado ante la descripción, por otros métodos, de IgM de

suero humano normal (Field y col., 1980) y macroglobulinémico (Harboe y Folling, 1974, Grov, 1975a).

Así, aunque se conoce una IgM sintetizada por una línea linfoblastoide humana que da reacción de precipitación directa con PA (Howell-Saxton y Weettstein, 1978), todas las otras IgM monoclonales reactivas con PA no dan esa reacción, ni la de inhibición, pero sí, en cambio, la de coprecipitación con IgG de conejo (Grov, 1975a) y, asimismo, se unen a PA-Sepharose (Grov, 1975a; Inganas, 1981; Romagnani y col., 1981b), y a células de *S. aureus* con PA (Harboe y Folling, 1974; Howell-Saxton y Wettstein, 1978).

Como no todas las IgM monoclonales ensayadas muestran reactividad con PA, éste fue un criterio de identificación de dos subclases de IgM (Harboe y Folling, 1974) que más adelante se ha rebatido (Inganas, 1981).

En el estudio de la localización del receptor de PA se ha mostrado que tanto las subunidades de una IgM monoclonal reactiva con PA, como sus fragmentos $(Fc)_5\mu$ y $Fc\mu$ se unen a PA-Sepharose, pero no los fragmentos $Fab\mu$ (Grov, 1975a), aunque ni $(Fc)_5\mu$ ni las subunidades son capaces de dar reacción de coprecipitación como la de la IgM intacta (Grov, 1975a).

De acuerdo con la reactividad observada para los monómeros de IgM, diversas estructuras intermedias del proceso de ensamblaje de IgM, desde pentámeros hasta complejos

μ L, incluyendo cadenas pesadas no glicosiladas, aislados de un lisado de células de una línea linfoblastoide humana, se unen a células de *S. aureus* con PA (Howell-Saxton y Wettstein, 1978). No obstante, la afinidad de las formas monoméricas es siempre menor que la de sus correspondientes formas pentaméricas (Harboe y Follin, 1974; Howell-Saxton y Wettstein, 1978).

La situación del receptor de PA en la molécula de IgM no está, sin embargo, bien establecida, pues la diferencia antigénica hallada entre dos IgM monoclonales, una reactiva con PA y otra no, no se ha podido asociar a los fragmentos (Fc) μ o Fab μ , sugiriendo que el determinante antigénico implicado pudiera ser de tipo conformacional, hallándosele en las subunidades de IgM (Grov, 1975b). Anticuerpos contra ese epitopo, ausente en la IgM no reactiva, son capaces de inhibir su reacción de coprecipitación con PA (Grov, 1975b).

Como la de IgA, la interacción de IgM con PA comprende un amplio rango de afinidades, tal como se manifiesta en las distintas fracciones de proteínas monoclonales (Grov, 1975a) o de sueros individuales normales (Field y col., 1980) que son retenidas en PA-Sepharose.

Entre las IgM de otros mamíferos se observan patrones de reactividad con PA similares a los de IgM humana

Así, las IgM de suero de perro y cerdo se distribuyen en fracciones unida y no unida a PA-Sepharose (Goudswaard y col., 1978), habiéndose descrito también la reactividad con PA de IgM de oveja (Bennell y Watson, 1980), de ratón (Chalon y col., 1979), cabra (Delacroix y Vaerman, 1979) y rata (Medgyesi y col., 1978), correspondientes a distintas fracciones en cada caso, del conjunto de IgM, desde el 40% de la de cerdo (Zikan, 1980b) al 3% de ratón (Ey y col., 1978), aunque se trata de determinaciones variables, según los laboratorios.

En el caso de la IgM de suero de cerdo, se ha mostrado que sus fragmentos Fab_μ se unen a PA-Sepharose, mucho mejor que los (Fc)_{5μ} (Zikan, 1980b) y, asimismo, para una IgM de ratón se ha señalado la posible implicación de las regiones C_μ2 en su interacción con PA (Mackenzie y col., 1978a).

También por el criterio de unión a PA-Sepharose se ha descrito la reactividad con PA de algunas IgM de vertebrados no mamíferos, como pollos, sapos y carpas (Zikan y col., 1980).

I.5.4.3. Inmunoglobulinas E.

Aunque no se conoce ninguna IgE monoclonal reactiva con PA, una pequeña fracción de la policlonal de suero

humano, 6-9%, se une a PA-Sepharose (Inganas y col., 1980).

De los fragmentos de IgE obtenidos por digestión con pepsina, el $F(ab')_2$ conserva la capacidad de unión a PA-Sepharose, pero no el Fc'' , constituido por un dímero de dominios $C\epsilon 2$. Como, además, esta interacción no resulta afectada en la inactivación del suero por calor, tratamiento que modifica la región C-terminal de la IgE, se ha sugerido que los dominios $C\epsilon 3$ y $C\epsilon 4$, no intervienen decisivamente en la unión de la IgE a la PA (Inganas y col., 1980).

I.5.4.4. Inmunoglobulinas D.

Junto a resultados negativos de reactividad de proteínas IgD monoclonales humanas con PA (Kronvall y col., 1970c; Forsgren y Grubb, 1979), se encuentra la evidencia de la interacción de la IgD de membrana, en experimentos de inmunoprecipitación (Kessler, 1976) o estimulación de linfocitos de sangre periférica (Romagnani y col., 1980).

I.5.5. El mecanismo alternativo de interacción de inmunoglobulinas con proteína A a través de sus regiones $F(ab')_2$.

La reactividad descrita para parte de los fragmentos $F(ab')_2$ de IgG de cerdo y cobayo (Endresen, 1979; Zikan, 1980a), o la de fragmentos Fab de IgA e IgM de cerdo (Zikan, 1980b) o de IgE humana (Inganas y col., 1980), en ensayos de unión a PA-Sepharose, o las reacciones de coprecipitación

en presencia de IgG de conejo, de $F(ab')_2\gamma$ de humano y co-bayo (Grov y Endresen, 1976), plantean la participación en la interacción con PA de un mecanismo no considerado, distinto del descrito a través de regiones Fc.

Verdaderamente, este otro tipo de reactividad con PA es diferente, tal como se deduce de experimentos de inhibición de la fijación de IgE e IgG humanas a PA-Sepharose, donde se observa que sólo fragmentos $F(ab')_2\gamma$, pero no $Fc\gamma$ son capaces de inhibir la fijación de IgE (Inganas y col., 1980). Asimismo, IgA e IgM monoclonales son capaces de inhibir la fijación de IgE a PA-Sepharose, aunque el efecto es variable para cada proteína (Inganas, 1981). En estos ensayos se encuentra actividad asociada a la región $F(ab')_2\alpha$, y que la fijación de $Fc\gamma$ a PA-Sepharose sólo es afectada por IgG, a través de su región Fc (Inganas, 1981).

La interacción de inmunoglobulinas mediada por este mecanismo alternativo resulta especialmente significativa en la reacción de precipitación directa con PA. Así, la inhibición de esta reacción de IgG policlonal por IgG de mieloma no precipitantes, está en relación inversa con la actividad inhibidora de la unión de IgE a PA -Sepharose de cada una de ellas, mientras que la inhibición de precipitación observada con los correspondientes fragmentos $Fc\gamma$ es similar (Inganas y Johansson, 1981).

Este mecanismo puede explicar también, las reac-

ciones de coprecipitación de fragmentos $F(ab')_2\gamma$ de IgG policlonal humana, así como la de proteínas IgA de mieloma con capacidad inhibidora de la fijación a PA-Sepharose de IgE, y la de sus fragmentos $F(ab')_2\alpha$ (Inganas y Johansson, 1981). Estas IgA, pero no otras que no dan reacción de coprecipitación, inhiben la reacción de precipitación directa de IgG policlonal (Inganas y Johansson, 1981).

Esta asociación entre reactividad alternativa y formación de complejos precipitables, puede observarse en la relación existente entre capacidad de inhibición de la unión de IgE a PA-Sepharose por distintas IgG de mieloma y la intensidad de sus correspondientes reacciones de precipitación (Inganas y Johansson, 1981). Análogamente para las IgG de otros mamíferos, de modo que las no precipitantes, como las de vaca o conejo (en este caso se conoce incluso la composición del complejo soluble: $(IgG_2-PA)_2$ (Mota y col., 1981)) tampoco afectan la interacción de IgE y PA-Sepharose, a diferencia de las precipitantes, como las de perro o cobayo (Kronvall y col., 1970a; Inganas y col., 1980).

Recientemente se ha detectado en estreptococos de los grupos G y C, un receptor que interacciona también con regiones Fab de inmunoglobulinas, aunque esa reactividad parece distinta de la equivalente de PA, en el sentido de las correspondientes especificidades, pues a diferencia

de la PA, este receptor de estreptococos reconoce mejor estructuras de IgG de conejo que de perro (Erntell y col., 1983).

I.6. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA PROTEINA A

La interacción de la PA con las inmunoglobulinas se pone de manifiesto, también, en la actividad observada en algunas de las funciones efectoras de inmunoglobulinas o relacionadas con ellas.

Así, la molécula de C3 resulta escindida cuando se mezclan PA e IgG humana en presencia de suero, pero no en su ausencia, lo que sugiere el inicio de actividades de la molécula de C1, por su unión, probablemente, a la IgG agregada por la PA (Stalenheim y Castensson, 1971). Esta activación del sistema del complemento se ha observado, asimismo, con IgG de cobayo (Stalenheim y Malmheden-Eriksson, 1971).

La PA produce un claro efecto antifagocítico de estafilococos por polimorfonucleares humanos (Forsgren y Quie, 1974; Peterson y col., 1977), actuando en los dos principales medios de opsonización: al unirse al Fc de los anticuerpos impide su reconocimiento por los receptores de Fc de los neutrófilos, y por la activación extracelular del complemento, evita el recubrimiento de la superficie bacteriana por moléculas de C3 y entonces no pueden unirse a los recep-

tores de C3 de las células fagocíticas, cuya efectividad, además, debe verse disminuida por el efecto inhibidor de quemotaxis de los complejos IgG-PA (Musher y col., 1981).

Por otro lado, da lugar a reacciones de hipersensibilidad en cobayos y conejos, similares a las mediadas por inmunocomplejos formados en exceso de anticuerpo (Gustaffson y col., 1968; Heczko y col., 1973) y reacciones de hipersensibilidad retardada, detectadas por la inhibición específica de la migración de leucocitos periféricos de cobayos sensibilizados con PA (Helgeland y col., 1975).

Ha sido descrito, asimismo, el aumento de actividad citotóxica natural (NK) de linfocitos humanos, contra distintas líneas tumorales, en presencia de PA (Vesella y col., 1978), aunque éste podría ser un efecto secundario a la estimulación de la producción de interferón y por los linfocitos (Catalona y col., 1981), el grupo celular directamente afectado por la PA (siguiente apartado). En todo caso, este efecto sobre varias de las actividades del sistema inmune, podría ser responsable de la actividad antitumoral observada en la regresión de tumores sólidos en ratas, perros y humanos, tras la inoculación de PA (Ray y Bandyopadhyay, 1983), o la reinfusión de los plasmas absorbidos con PA insolubilizada (Ray y col., 1982; Terman y col., 1980), casos en los que el efecto se sospecha pueda deberse a la presencia de PA liberada desde el medio de absorción (Ray y Bandyopadhyay, 1982).

I.6.1. Proteína A como mitógeno de linfocitos.

Desde los primeros resultados de estimulación por PA de la proliferación "in vitro" de linfocitos humanos, estimada como aumento de síntesis de DNA (Rodey y col., 1972), se han efectuado numerosos estudios sobre su mecanismo, los tipos celulares implicados y la comparación con otros mitógenos conocidos.

Esta actividad es dependiente de la forma en que se encuentra la PA. Así, mientras en solución estimula específicamente linfocitos T humanos y de ratón (Sakane y Green, 1978; Romagnani y col., 1978, Schuurman y col., 1980, Nakao y col., 1980), como PA-Sepharose o células de *S. aureus* formalinizadas, es un activador policlonal de células B, a diferencia de la PA soluble, pero, sin embargo, no muestran efecto sobre las células T (Forsgren y col., 1976; Romagnani y col., 1978; Schuurman y col., 1980).

La estimulación por células de *S. aureus* de linfocitos B es un fenómeno dependiente de células T, si se estima como secreción de inmunoglobulinas (Lipsky, 1980; Falkoff y col., 1982), pero la sola proliferación celular es independiente de la presencia de células T (Falkoff y col., 1982), contribuyendo de este modo a la diferenciación de las etapas de maduración de los linfocitos B (Muraguchi y col., 1983). En lo que respecta a las células T, la capacidad mitogénica de la PA es comparable a la de la fitohemaglutinina, y mucho

mayor que la de la concanavalina A (Sakane y Green, 1978, Ringden y Rynnel-Dagoo, 1978), dos lectinas mitógenos de linfocitos T.

Además de la heterogeneidad de tipos celulares afectados en los distintos estudios "in vitro", dependiendo de la procedencia de las células o su estadio de diferenciación, y de las actividades observadas según la forma de PA utilizada, se encuentra la cuestión de cual o cuales son los elementos celulares implicados.

En el caso de las células T, y relacionado con su polémico receptor de antígeno y con la ausencia de inmunoglobulinas en su superficie, se ha postulado un mecanismo de activación no mediado por inmunoglobulinas (Nakao y col., 1980), aunque, sin embargo, es inhibido por IgG policlonal humana (Sumiya y col., 1980). Incluso esta estimulación ha sido atribuida a la presencia de pequeñas cantidades de enterotoxina estafilocócica, un potentísimo mitógeno de células T, en las preparaciones comerciales de PA utilizadas (Smith y col., 1983), o a la interacción con los antígenos de histocompatibilidad (Paterson y col., 1975; Schuurman y col., 1980).

Por lo que respecta a las células B, que mayoritariamente llevan en membrana inmunoglobulinas no IgG (Winchester y col., 1975), se ha determinado que linfocitos

B de sangre periférica o tonsilo, normales, o de pacientes con leucemia linfocítica crónica, con IgM e IgD en superficie, son activados por células de *S. aureus* (Romagnani y col., 1980; Romagnani y col., 1981a; Romagnani y col., 1981b). Esta estimulación de células B, tanto de individuos normales como de pacientes con leucemia, está relacionada con la interacción de la PA con las regiones $F(ab')_2$ de las inmunoglobulinas de membrana, como sugiere el que sea inhibida por IgG humana y sus fragmentos $F(ab')_2\gamma$, pero no por IgG que no muestran reactividad alternativa, tipo Fab (apartado I.5.5.), y por el hecho de que los linfocitos interesados son capaces de formar rosetas con eritrocitos cubiertos de PA, cuando no hay en el medio anticuerpos anti-inmunoglobulina (Romagnani y col., 1981b; Romagnani y col., 1982a).

I.7. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Ya que la reactividad alternativa de inmunoglobulinas con PA se ha establecido como tal recientemente, e incluso hay reticencias para su consideración como mecanismo de esta interacción, resultaría conveniente ampliar la información disponible sobre ella, que es el objetivo general de este trabajo.

En primer lugar, se ha abordado la caracterización de la reactividad de inmunoglobulinas no IgG, que según se ha descrito carecen de la reactividad clásica, tipo Fc. Para ello se ha escogido la IgM de suero humano, debido a la utilización de un procedimiento de purificación que ha facilitado su aislamiento, respecto del de la IgA, pues IgE e IgD, por sus bajísimas concentraciones en suero, no se consideraron. Que, inicialmente, se haya trabajado con IgM policlonal, ha sido para tratar de darle un carácter general a los resultados obtenidos, frente a la información disponible, que hace referencia sólo a IgM monoclonales.

La interacción de la IgM policlonal humana se ha estudiado en relación con la de IgG policlonal y sus fragmentos, tanto en experimentos con PA en fase sólida, como en solución, para una mejor identificación de las reactividades observadas.

Por otro lado, mientras el receptor de PA de las

regiones F_{cy} está perfectamente definido, se sabe mucho menos del que media la reactividad alternativa, excepto su relación con las regiones $F(ab')_2$ de inmunoglobulinas, e incluso, en este sentido, con resultados contradictorios. Por ello se ha tratado de determinar cuál puede ser la estructura que media la interacción de inmunoglobulinas y PA a través del mecanismo alternativo. En este caso, se ha utilizado una IgM monoclonal, que por su naturaleza homogénea permite considerar más fácilmente la reactividad asociada a las distintas regiones de su molécula, obtenidas por digestión enzimática controlada o por disociación de sus cadenas en medios reductores, y su comparación con la de la IgM intacta, para establecer la localización de la estructura a través de la que se une a la PA.

Sería asimismo de gran interés, poder extender las conclusiones obtenidas del estudio de una proteína monoclonal, al conjunto de inmunoglobulinas que muestran la reactividad alternativa, de modo que permita explicar sus características, como son la heterogeneidad y distribución entre las distintas clases de inmunoglobulinas y especies animales, o su incidencia en la formación de complejos precipitables con PA o en los fenómenos de estimulación de linfocitos. Para desarrollar esta parte del trabajo, se ha buscado una actividad antigénica asociada a la interacción alternativa, con la que poder estudiar inmunoquímicamente su expresión en las distintas clases de inmunoglobulinas y en relación con su reactividad con la PA.

MATERIALES Y METODOS

- II.1. Purificación de inmunoglobulinas.
- II.2. Preparación de fragmentos de inmunoglobulinas.
- II.3. Obtención de antisueros y anticuerpos.
- II.4. Técnicas de inmunoprecipitación en gel.
- II.5. Técnicas electroforéticas.
- II.6. Marcaje radiactivo de proteínas.
- II.7. Mapas bidimensionales de péptidos yodados.
- II.8. Radioinmunoensayos.
- II.9. Interacción con proteína A.
- II.10. Materiales.

II.1. PURIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS

En la purificación de inmunoglobulinas y la preparación de sus fragmentos, así como en el aislamiento de anticuerpos, se han seguido técnicas de fraccionamiento convencionales, como la cromatografía de afinidad, de intercambio iónico o de filtración en gel, que se detallan para cada caso más adelante. Aquí se describen procedimientos comunes a todas las purificaciones.

II.1.1. Concentración de soluciones de proteína.

II.1.1.1. Ultrafiltración.

Consiste en la reducción del volumen de la solución por el paso, bajo presión positiva o negativa, del disolvente a través de un filtro que no deja pasar las proteínas, debido a su mayor tamaño molecular.

Se han empleado como filtros membranas Diaflo PM10 y XM50, que son permeables a compuestos de pesos moleculares de hasta 10000 y 50000, respectivamente, en una célula de ultrafiltración de Amicon.

Las concentraciones se efectúan a 4°C, hasta el volumen deseado, con nitrógeno comprimido, a una presión de 1 kg/cm². Después, las membranas se conservan en tampones con 0.1% azida sódica, p/v, en la nevera, en 50% etanol, v/v, si es por períodos prolongados. Ocasionalmente se lavan con

0.1% Triton X-100, v/v, cuando el caudal que proporcionan disminuye a causa de la adsorción de proteínas a su superficie.

II.1.1.2. Diálisis.

Tiene el mismo fundamento, aunque el movimiento de solutos es pasivo. Se efectúa en membranas de celulosa en forma de tubo, que se hidratan en agua destilada en ebullición, durante 20 minutos, para lavar la glicerina y otros compuestos que llevan. Después se comprueba que no están rotas y, tras anudar uno de sus extremos, se introduce la solución que quiere concentrarse, anudándose el otro tras haber sacado la mayoría del aire.

La bolsa de diálisis se introduce en un vaso de precipitados con PEG de peso molecular 40000 semisólido (el tamaño de poro de la membrana permite el paso de solutos de peso molecular en torno a 10000), o con Sephadex seco, que extraen el solvente. Este procedimiento se utiliza cuando los volúmenes a concentrar son pequeños, 2-10 ml.

Del mismo modo se hacen los cambios de disolvente, introduciendo la bolsa en volúmenes del nuevo tampón en que se quiere poner la proteína, 200-300 veces mayor que el de la solución que se dializa. Esto suele hacerse con agitación, a temperatura ambiente, durante 18 horas, o a 4°C si es por más tiempo, renovando el tampón si es necesario.

II.1.1.3. Cálculo de concentración de las soluciones de proteína.

Se hace a partir de su A_{280} y de los correspondientes coeficientes de absorción (tabla II.1.). Las lecturas se han efectuado en espectrofotómetros Beckman, modelos 25 y DU-5, diluyendo convenientemente las soluciones, para que el valor de absorbancia sea < 1.0 , utilizando como cero de absorbancia la del disolvente que se trate.

II.1.2. Purificación de IgG policlonal humana y de otros mamíferos.

II.1.2.1. Cromatografía de afinidad en PA-Sepharose.

Es un procedimiento utilizado habitualmente en el aislamiento de IgG de numerosos mamíferos (Goding, 1978; Lindmark y col., 1983), basado en la afinidad de estas inmunoglobulinas por la proteína A de *S. aureus*, empleando como material de partida sueros, preparados como se indica en II.3.1..

El medio cromatográfico, PA-Sepharose, se hidrata en el tampón habitual de utilización, PBSA (tabla II.2.), y con 3g se hace una columna de 2 x 3.3 cm, que se equilibra en el mismo tampón y en la que se cromatografían alícuotas de no más de 10 ml de suero. La columna se lava con PBSA a 100 ml/h, recogiendo el eluido en fracciones de 4.2 ml, hasta

Tabla II.1. PESOS MOLECULARES Y COEFICIENTES DE ABSORCION UTILIZADOS EN EL CALCULO DE CONCENTRACIONES

Immunoglobulinas y fragmentos de IgG			Fragmentos de IgM	
	$M_r \times 10^{-3}$	$A_{280, 1cm}^{1\%}$		$M_r \times 10^{-3}$
				$A_{280, 1cm}^{1\% (\S)}$
IgM	900	11.8	(Fc) ₅ μ	340(a)
IgA	150	10.6	Fc μ	33(b)
IgG	150	14.3	F(ab') ₂ μ	114(c)
F(ab') ₂ γ	104	14.8	Fab' μ	57(c)
Fab' γ	52	14.8	Fab μ	48(a)
Fab γ	50	15.3	Monómeros	180(d)
Fc γ	50	12.2	Fv	25(e)
L	25	11.8	V _H	13(e)
			V _L	13(e)

Los coeficientes de absorción y los pesos moleculares se han tomado de Hudson y Hay, 1976 y de Eisen, 1980a, excepto los señalados con letras.

(§), los coeficientes de absorción de los fragmentos de IgM se han tomado iguales al de la IgM intacta.

Otras referencias: a, Zikan y Bennett, 1973; b, Hester y col., 1975; c, Miller y Metzger, 1966; d, Miller y Metzger, 1965; e, Lin y Putnam, 1978.

que su A_{280} es < 0.04 , figura II.1..

Para recuperar la proteína retenida en la columna se cambia el tampón de elución, utilizando citrato sódico 0.1M o glicocola-HCl 0.1M, de pH 2.5. Los tubos donde se colecta el eluido contienen 0.1 ml de Tris-HCl 2.5M, pH 8.5, para su inmediata neutralización. Las fracciones con $A_{280} > 0.05$, se reúnen y concentran por ultrafiltración, conservándose congeladas a -20°C después de dializarlas contra PBSA.

Una vez utilizada, la columna de PA-Sepharose se reequilibra en PBSA y se conserva a 4°C .

El rendimiento conseguido depende de cada suero, según la afinidad de su IgG por la columna, con extremos en 12 y 6 mg/ml de gel para el de cerdo y vaca, respectivamente. Tras electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, figura II.1., este material migra con movilidad similar a la de la IgG humana.

Habitualmente, la IgG humana así purificada, se cromatografía después en una columna de Sephacryl S-200 de 2 x 150 cm, equilibrada en PBSA, para conseguir una preparación libre de agregados.

II.1.2.2. Purificación de una IgG3 monoclonal humana.

Se aisló del suero del paciente Fra, con mieloma múltiple. La inmunoglobulina monoclonal se identificó como

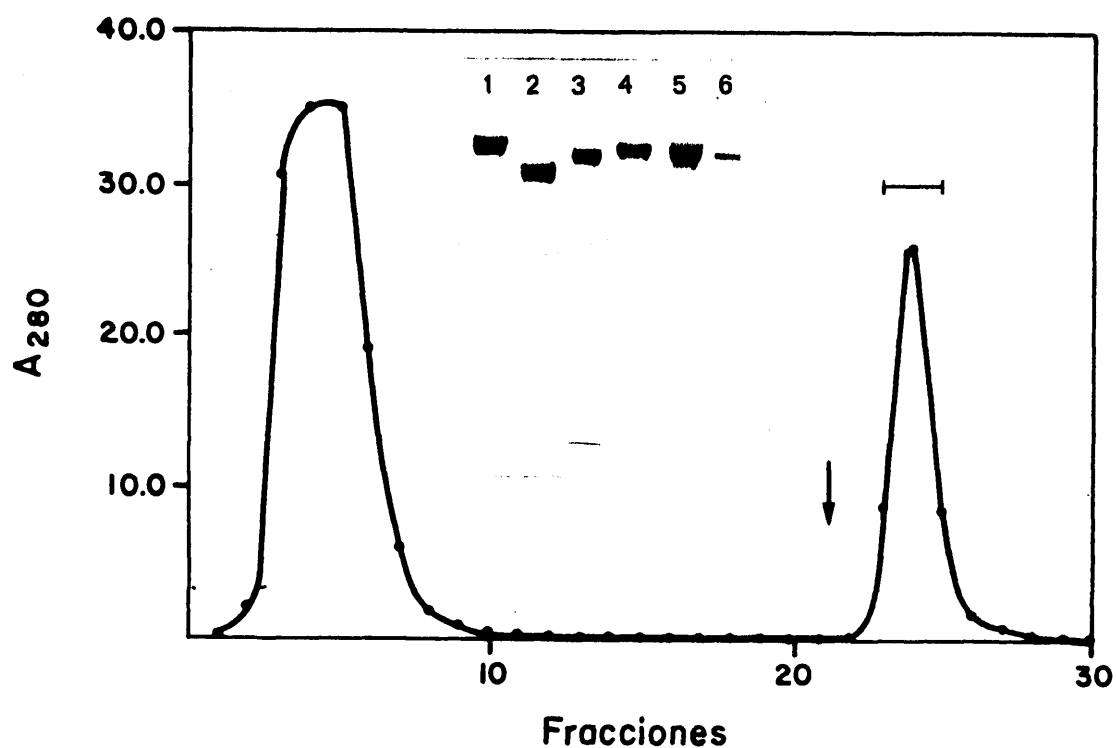


Figura II.1. Aislamiento de IgG de suero por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose. El procedimiento se ilustra con el cromatograma correspondiente a la cromatografía de 10 ml de suero de cerdo en una columna de 2 x 3.3 cm de PA-Sepharose equilibrada en PBSA. Las fracciones recogidas son de 3.2 ml y el flujo de 100 ml/h. La flecha indica el inicio de la elución con citrato sódico 0.1M, pH 2.5. Se muestra también el análisis por SDS-PAGE, en un gel de 3.5%C y 7%T, de las IgG obtenidas de modo similar a partir de suero humano (1), conejo (2), cobayo (3), perro (4), cerdo (5) y vaca (6), en picos como el señalado en el cromatograma.

IgG3(κ), por su reacción con antisueros específicos de Fc γ , de cadena κ y de subclase IgG3.

La IgG3 Fra se aisló por cromatografía de intercambio iónico, a partir de la fracción de suero que no es retenida en PA-Sepharose y que así carece del resto de proteínas IgG, que son fijadas a la columna de afinidad (II.1.2.1.).

II.1.2.2.1. Preparación del intercambiador iónico de celulosa.

Aunque aquí se refiere a la carboximetilcelulosa utilizada en la purificación de la IgG Fra, el procedimiento es similar al seguido con las celulosas microfibrilares empleadas en otras purificaciones.

La celulosa se hidrata en el tampón en el que se iniciará la cromatografía, 10 veces más concentrado, para facilitar un más rápido equilibramiento del intercambiador. La pasta se separa en un filtro de Buchner, o por decantación, y se vuelve a resuspender en tampón, otras 3-4 veces, hasta que el pH de la suspensión se aproxima al del tampón que se está utilizando.

La suspensión se deja reposar ahora, y antes de que sedimente completamente, se quita el tampón con las partículas más finas de celulosa, que podrían obstruir el soporte de la columna y disminuir su flujo.

Finalmente, la celulosa se resuspende en el tampón

de cromatografía y se vierte en una columna, donde se empaqueta hasta conseguir el tamaño deseado. Entonces se lava con 10 volúmenes del mismo tampón, o más, si fuese necesario para igualar el pH y la conductividad del efluente con el del tampón de equilibrado. Las medidas se han efectuado en pHmetro Century SS-1, de Beckman o pHM83 autocal, de Radiometer, y en un conductímetro 525 de Crison.

II.1.2.2.2. Aislamiento de la IgG3 Fra.

La fracción de suero Fra no unida a PA-Sepharose se pone en tampón de cromatografía por diálisis contra fosfato sódico 0.01M, pH 7.0. La muestra se carga en la columna, de 2 x 16.5 cm de CM-celulosa, equilibrada y eluida con ese tampón, manteniendo un flujo de 60 ml/h, hasta que las fracciones recogidas, de 4.2 ml, tienen una $A_{280} < 0.02$. La IgG3 sale en un segundo pico que se retrasa respecto del conjunto de proteínas que no interaccionan con la columna, figura II.2..

La IgG3 así obtenida, se conserva a -20°C y su pureza se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida, donde a diferencia de la IgG policlonal produce una estrecha banda, y cuando se analiza reducida y en presencia de SDS, su cadena pesada muestra la característica movilidad, menor que la de las otras subclases (figura II.2.), de acuerdo con su mayor peso molecular (Patrick y Virella, 1978).

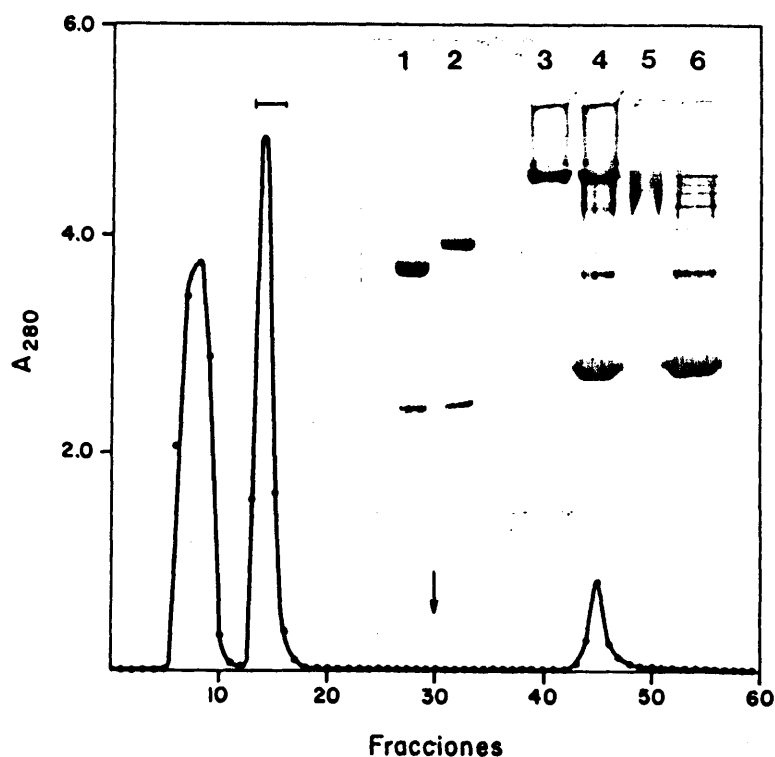


Figura II.2. Aislamiento de la IgG3 monoclonal Fra. El cromatograma muestra el fraccionamiento de la fracción de suero Fra no retenida en PA-Sepharose en una columna de CM-celulosa, 2 x 16.5 cm, equilibrada en fosfato sódico 0.01M, pH 7.0. El flujo es de 60 ml/h y las fracciones de 4.2 ml. La flecha muestra el inicio de elución con ese mismo tampón conteniendo NaCl 1M. Se señalan las fracciones recogidas con IgG3. Los electroforetogramas corresponden al análisis en un gel de poliacrilamida de 3.5%C y 7%T del suero Fra (4) y su IgG3 (3), comparando con el de suero normal (6) y la IgG policlonal (5), por un lado, y de otro, en un gel de 3.5%C y 10%T, con SDS, de la IgG3 Fra (2) y de la IgG policlonal (1), reducidas.

II.1.2.3. Purificación de IgA policlonal humana.

Como material de partida se utilizó la fracción de suero humano normal que precipita al añadir sulfato amónico hasta una concentración 50% de la de saturación, procedente de procesos de purificación distintos, pero que sirve para la obtención de IgA, ya que la mayoría de ella se encuentra en esta fracción (Heide y Schwick, 1978).

Disuelta en PBSA, se añade sulfato de zinc sólido, para conseguir una concentración 0.05M, llevando el pH a 6.8 con carbonato sódico, y se mantiene a 22°C con agitación, durante 2 horas. La suspensión formada se centrifuga a 10000 rpm, en un rotor JA-14 de Beckman, durante 15 minutos, para retirar el precipitado de IgG (Heide y Schwick, 1978).

Al sobrenadante se añade glicocola hasta una concentración final de 2%, p/v, para acomplejar los iones Zn^{++} , teniendo 30 minutos a 28°C y centrifugándolo en las mismas condiciones que antes. La IgA presente en este nuevo sobrenadante, se concentra por precipitación con sulfato amónico 1.8M y se purifica en un intercambiador aniónico.

La DEAE-celulosa se equilibra como se indica en II.1.2.2.1., en Tris-HCl 0.03M, pH 7.9. La muestra, dializada contra ese tampón, se cromatografía en una columna de 2 x 16 cm, a 90 ml/h. Cuando la A_{280} de las fracciones es < 0.02 , se eluye con un gradiente lineal de concentración de cloruro sódico, conseguido al mezclar 100 ml del tampón Tris-HCl con

100 ml del mismo tampón con cloruro sódico 0.4M.

El primer pico del cromatograma de la figura II.3. contiene sólo IgG, en tanto que la IgA se halla en las fracciones del pico principal que eluye con el gradiente de sal, donde se detecta por inmunodifusión con sueros anti-IgA.

De este material se obtiene la IgA por cromatografía de afinidad en PA-Sepharose, donde se eluye con tampón ácido el 25% de la proteína cromatografiada, que además de IgA contiene una pequeña cantidad de IgG. Ello hace necesario, finalmente, la cromatografía en una columna de afinidad con anticuerpos anti-Fc γ (II.3.3.), para retirar cualquier IgG presente en esta preparación de IgA, cuyo análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida se muestra en la figura II.3..

II.1.2.4. Purificación de IgM policlonal humana.

El suero empleado en su aislamiento es la mezcla de alícuotas de 1-3 ml del de, aproximadamente, 300 individuos, al que se añade azida sódica hasta 0.1%, p/v, para conservarlo a 4°C, después de haberlo centrifugado durante 30 minutos a 10000 rpm en un rotor GSA de Sorvall.

La IgM de este suero se obtiene en la fracción de macroglobulinas que se prepara por filtración de 50 ml del mismo en una columna de 3.5 x 98 cm de Sephacryl S-300, equi-

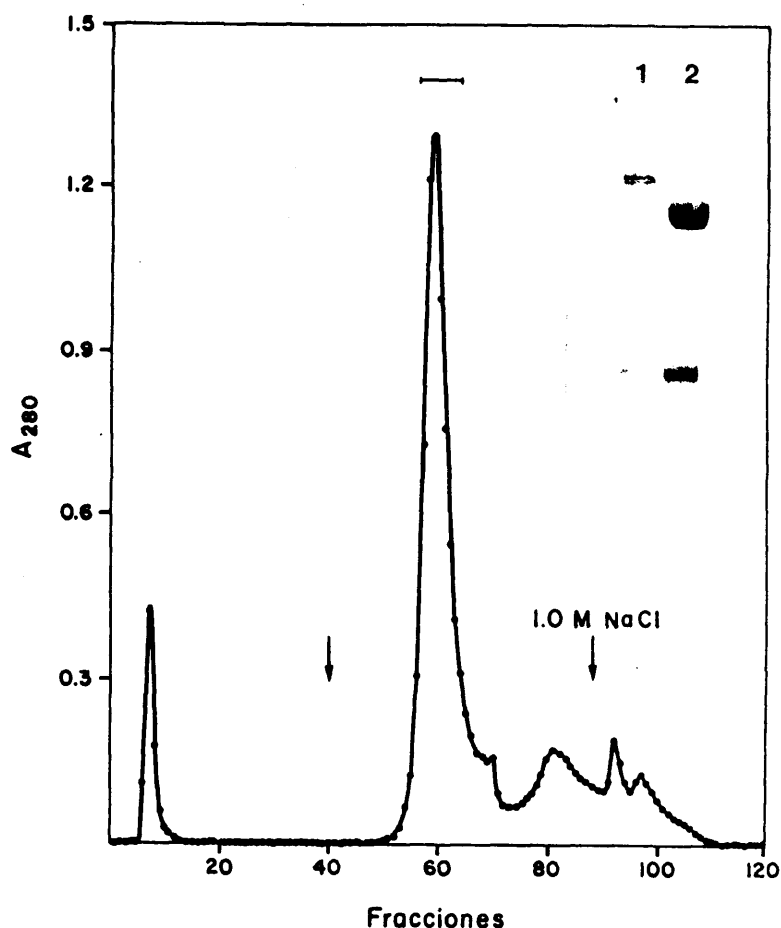


Figura II.3. Aislamiento de IgA de suero humano normal. Cromatografía de la fracción de suero precipitada con sulfato de zinc (II.1.2.3.) en una columna de DEAE-celulosa, 2 x 16 cm, equilibrada en Tris-HCl 0.03M, pH 7.9. El flujo es de 90 ml/h y las fracciones de 4.2 ml. La primera flecha señala el inicio de la elución con un gradiente de concentración sal (100 ml de Tris-HCl 0.03M, pH 7.9 y 100 ml del mismo tampón con NaCl 0.4M. Finalmente, el tampón de elución contiene NaCl 1.0M. Se muestra también el análisis por SDS-PAGE de la IgA reducida (1), en un gel de 3.5%C y 10%T, junto al patrón de IgG reducida (2). La IgA analizada es la fracción unida a PA-Sepharose no retenida en anti-Fc γ -Sepharose (II.1.2.3.) de la presente en el pico señalado en el cromatograma.

librada y eluida con PBSA a 40 ml/h, cogiendo fracciones de 4.3 ml. Aunque el volumen de muestra excede al adecuado para una resolución óptima, como las fracciones que contienen la IgM están suficientemente separadas de las que contienen IgG, en el primero de los dos picos principales del cromatograma de la figura II.4., que es la finalidad de este paso cromatográfico, se pueden así procesar mayores cantidades de suero de una sola vez.

La fracción de macroglobulinas obtenida se cromatografía ahora en una columna de 10 ml de PA-Sepharose, figura II.5. (de ahí el interés en que las cantidades de IgG en la fracción con IgM fuesen mínimas) equilibrada y eluida en PBSA, a 100 ml/h, hasta que la A_{280} del eluido es < 0.02 . La recuperación del material retenido en la columna se hace con un tampón citrato sódico 0.1M, pH 2.7, recogiendo el eluido en tubos con un pequeño volumen de Tris-HCl 2.5M, pH 8.5, para su neutralización. La figura II.5. muestra también el análisis de este paso cromatográfico, por electroforesis en gel de poliacrilamida.

En la tabla II.2. se muestra la composición de los tampones utilizados cuando la elución de PA-Sepharose se hace bajando el pH discontinuamente.

Para desechar los agregados que se hallan en suero, y los producidos en el proceso de aislamiento, las preparaciones de IgM se cromatografían sistemáticamente en una

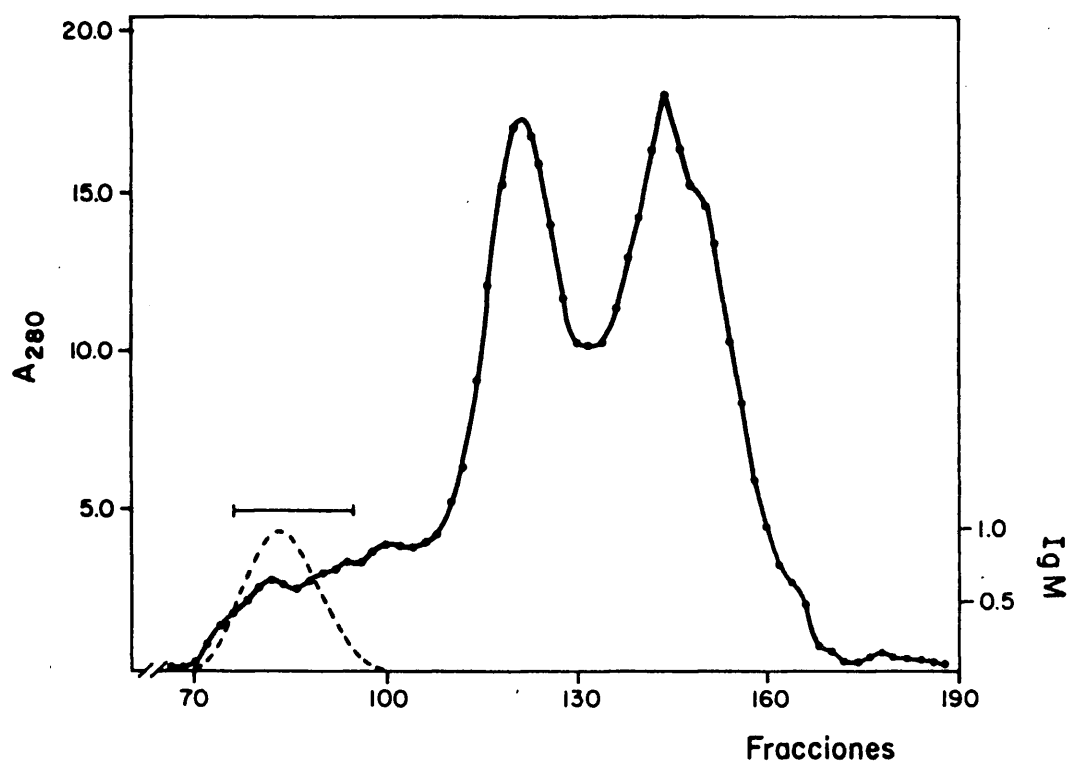


Figura II.4. Aislamiento de IgM de suero normal. Cromatografía de 50 ml de suero humano en una columna de Sephacryl S-300, 3.5 x 98 cm, eluida con PBSA a 40 ml/h. Las fracciones son de 4.3 ml y se señalan las recogidas conteniendo IgM, de acuerdo con su distribución, trazo discontinuo, detectada por inmunodifusión radial, y representada respecto de los valores máximos de concentración de IgM.

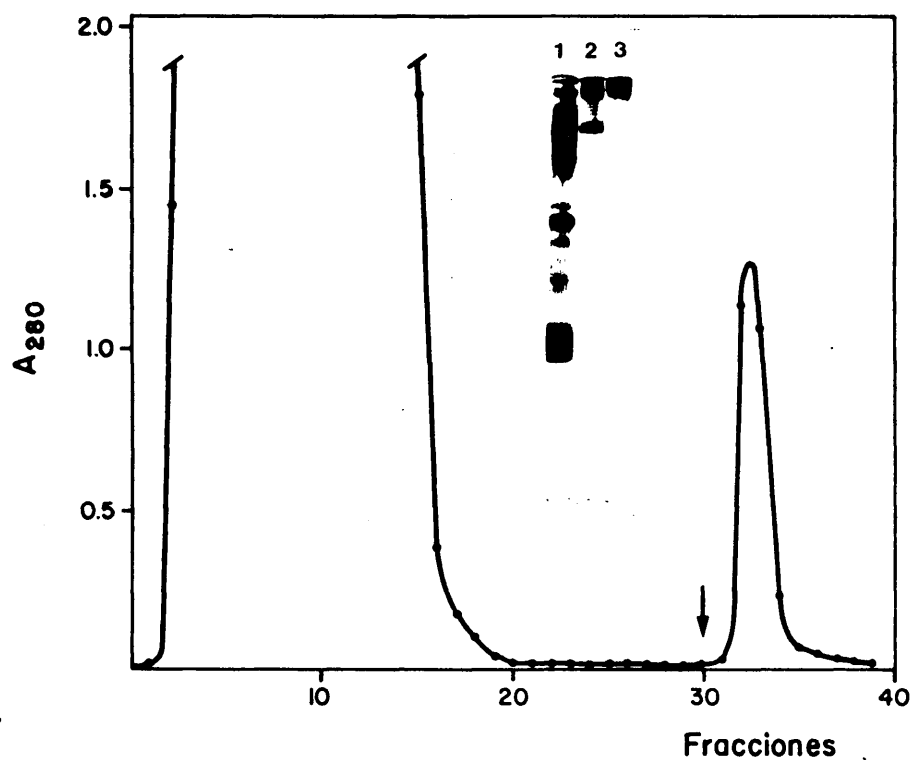


Figura II.5. Aislamiento de IgM de suero humano normal por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose. Cromatografía de la fracción de macroglobulinas de suero humano (figura II.4.) con IgM en una columna de PA-Sepharose, 2 x 3.3 cm, equilibrada en PBSA. El flujo es de 100 ml/h y las fracciones de 5 ml. La flecha indica el inicio de la elución con citrato sódico 0.1M, pH 2.7. Se muestra, asimismo, el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida, 5.25%C y 8%T, de suero humano, tubo 1, y de las fracciones de macroglobulinas no unida (tubo 2) y unida (tubo 3) a la columna de PA-Sepharose.

Tabla II.2. TAMPONES UTILIZADOS EN CROMATOGRAFIA DE
AFINIDAD EN PA-SEPHAROSE

Equilibrado de columna

PBSA: fosfato sódico 25mM (PO_4NaH_2 15.7mM, PO_4Na_3 9.2mM), pH 7.4,
cloruro sódico 0.15M y azida sódica 0.1%, p/v.

TA : Tris-HCl 50mM, pH 7.6, cloruro sódico 0.12M y azida sódica,
0.1%, p/v.

Elución ácida

Citrato sódico 0.1M:

pH 6.1:	citrato trisódico 91.6mM, ácido cítrico 8.4mM			
pH 5.1:	"	70.3mM,	"	29.7mM
pH 4.4:	"	51.8mM,	"	48.2mM
pH 4.0:	"	41.0mM,	"	59.0mM
pH 3.4:	"	27.8mM,	"	73.2mM
pH 2.7:	"	9.1mM,	"	91.9mM
pH 2.5:	"	6.2mM,	"	93.4mM

Glicocola-HCl 0.1M, pH 2.5

columna de Sepharose 6B, recogiendo el pico con las fracciones siguientes a las del volumen excluido, figura III.3., que luego se concentran por ultrafiltración, con una membrana XM50, y se conservan en alícuotas de 1 ml, a -70°C , descongelándolas una sola vez, para prevenir su agregación.

II.1.2.4.1. Purificación de la IgM sin afinidad por PA-Sepharose.

Se aísla de la fracción de macroglobulinas que no se une a PA-Sepharose, la cual contiene un 50-60% de la IgM inicial (tabla III.1.), por cromatografía de afinidad en una columna con anticuerpos anti-(Fc) $_{5\mu}$ (II.3.3.), de donde se eluye con un tampón glicocolá-HCl 0.1M, pH 2.6, en tubos con Tris-HCl 2.5M, pH 8.5 (II.1.2.4.).

La figura II-6. muestra el cromatograma correspondiente a una de estas purificaciones. La forma del pico eluido con tampón ácido puede deberse a la heterogeneidad de la afinidad de los anticuerpos inmovilizados en la agarosa. Esta IgM, cuyo patrón electroforético en gel de poliacrilamida con SDS se muestra en la misma figura, se dializa contra PBSA y se conserva congelada a -70°C .

II.1.2.5. Purificación de una IgM monoclonal humana.

Se hace a partir del fluido obtenido por plasmaféresis del paciente Iz, con macroglobulinemia de Waldestrom.

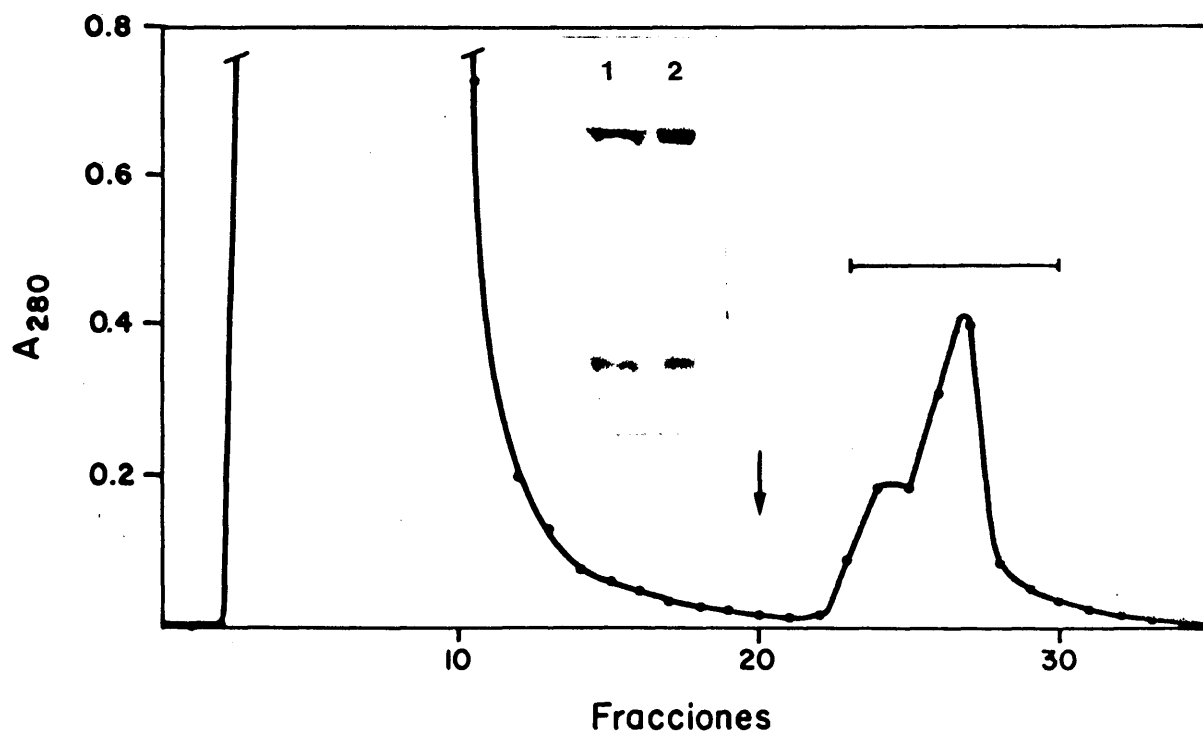


Figura II.6. Aislamiento de la IgM de suero normal sin afinidad por PA-Sepharose. Cromatografía de la fracción de macroglobulinas de suero humano con IgM no unida a PA-Sepharose en 4 pasadas en una columna de IgG anti-(Fc)₅ μ -Sepharose, 2.6 x 3.6 cm, equilibrada en PBSA. El flujo es de 60 ml/h y las fracciones de 5 ml. La flecha indica el inicio de la elución con Gly-HCl 0.1M, pH 2.6. Se muestra el análisis por SDS-PAGE de la IgM así aislada, en el pico señalado, (1), junto al de la IgM purificada por cromatografía de afinidad con A-Sepharose (2), reducidas, en un gel de 3.5%C y 10%T.

La figura II.7. muestra el aumento de la turbidez del plasma debido a la precipitación de la IgM, causada al reducir su fuerza iónica por dilución con agua destilada. De acuerdo con ello, para el aislamiento de esta euglobulina, se mezcla un volumen de plasma y 16 de agua.

La precipitación se hace a temperatura ambiente y el sedimento se recoge tras centrifugar la suspensión, 20 minutos a 10000 rpm en un rotor JA-14 de Beckman, y después de disolverlo en PBSA se precipita del mismo modo, una vez más, para retirar aquellas proteínas que coprecipitan asociadas a la IgM. El sedimento de la centrifugación se conserva a -20°C .

II.1.2.6. Aislamiento de proteínas Bence-Jones.

Son dímeros no covalentes de cadenas ligeras monoclonales, secretadas en la orina de enfermos de mieloma (Putnam, 1977a). Una de estas proteínas, la Viz, fue cedida por el Dr. E. Méndez, del Servicio de Endocrinología del Centro Ramón y Cajal. Otra, fue aislada de la orina de un paciente, Bla, tras su concentración por ultrafiltración y cromatografía en una columna de Sephacryl S-200 de 2 x 150 cm, equilibrada en PBSA.

El tipo de cadena ligera de estas proteínas se identificó por doble inmunodifusión contra antisueros específicos de tipo, resultando λ el de la Viz y κ el de la Bla.

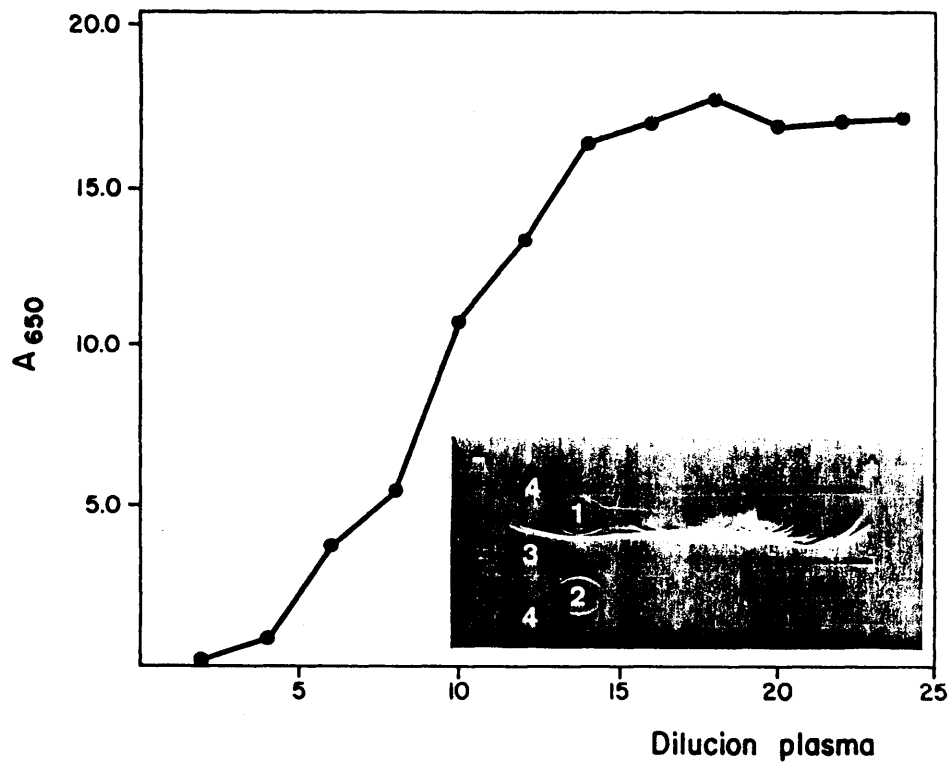


Figura II.7. Euprecipitación del plasma macroglobulinémico Iz. Se representa la turbidez del plasma Iz, como A_{650} , correspondiente a su dilución con cantidades crecientes de agua destilada. Se muestra asimismo el análisis por inmunoelectroforesis del material así euprecipitado (2) y el del plasma de partida (1), con sueros anti-suero humano total, (3) y anti IgM específico (4).

II.2. PREPARACION DE FRAGMENTOS DE INMUNOGLOBULINAS

En este apartado se describe la preparación de diversos fragmentos de inmunoglobulinas, producidos por proteólisis controlada, así como la de sus subunidades o cadenas pesada y ligera, tras la reducción parcial de sus puentes disulfuro.

II.2.1. De IgG humana.

Se obtienen a partir de preparaciones comerciales de IgG policlonal.

II.2.1.1. Preparación de los fragmentos Fab y Fc.

Son productos de la proteólisis de la IgG con papaína (Porter, 1959). La IgG, 20 mg/ml en fosfato sódico 0.1M, pH 7.0, EDTA 2mM, se precalienta en un baño a 37°C. Entonces se añade papaína sólida, de modo que la relación enzima:IgG es 1:100, en peso. La digestión se detiene 16 horas después, inactivando la papaína con yodoacetamida 0.01M.

Los productos de la digestión se separan por cromatografía de intercambio iónico, en una columna de DEAE-Sephacel (partículas esféricas de celulosa, en vez de fibrillas), de 3 x 20 cm, equilibrada en Tris-HCl 0.04M, pH 8.0, cogiendo fracciones de 6 ml, a 100 ml/h. Cuando la A_{280} del eluido es < 0.03 se inicia el paso de un gradiente lineal de concentra-

ción de sal, formado por la mezcla de 200 ml de Tris-HCl 0.04M, pH 8.0 y 200 ml del mismo tampón con cloruro sódico 0.5M.

El pico con la proteína no retenida en la celulosa está constituido por el fragmento Faby, como indica su análisis por inmunoelectroforesis, figura II.8.. El Fcy se encuentra en las fracciones señaladas del segundo pico del material eluido de la columna con el aumento de fuerza iónica, y para liberarlo de la IgG no digerida que sale delante, se cromatografía en una columna de 2 x 154 cm de Sephacryl S-200, equilibrada en PBSA, figura II-9A, de donde se recoge en las fracciones del pico principal.

Ya que en inmunoelectroforesis se detecta una débil contaminación de esta preparación de Fcy por Faby, probablemente aquellos más ácidos, se cromatografía en una columna de PA-Sepharose, desechando todo lo que no se fija a la misma, figura II-9B. El Fcy eluido con glicocola -HCl 0.1M, pH 2.5, ya no da reacción de precipitación con antisueros con actividad contra cadenas ligeras, figura II-9B.

Ambos fragmentos, Faby y Fcy, dializados contra PBSA, se conservan a -20°C .

II.2.1.2. Obtención del fragmento F(ab')₂γ.

Se aísla del digerido de la IgG con pepsina (Bennich y Turner, 1969). La IgG, 25mg/ml en acetato sódico 0.1M, pH 4.4,

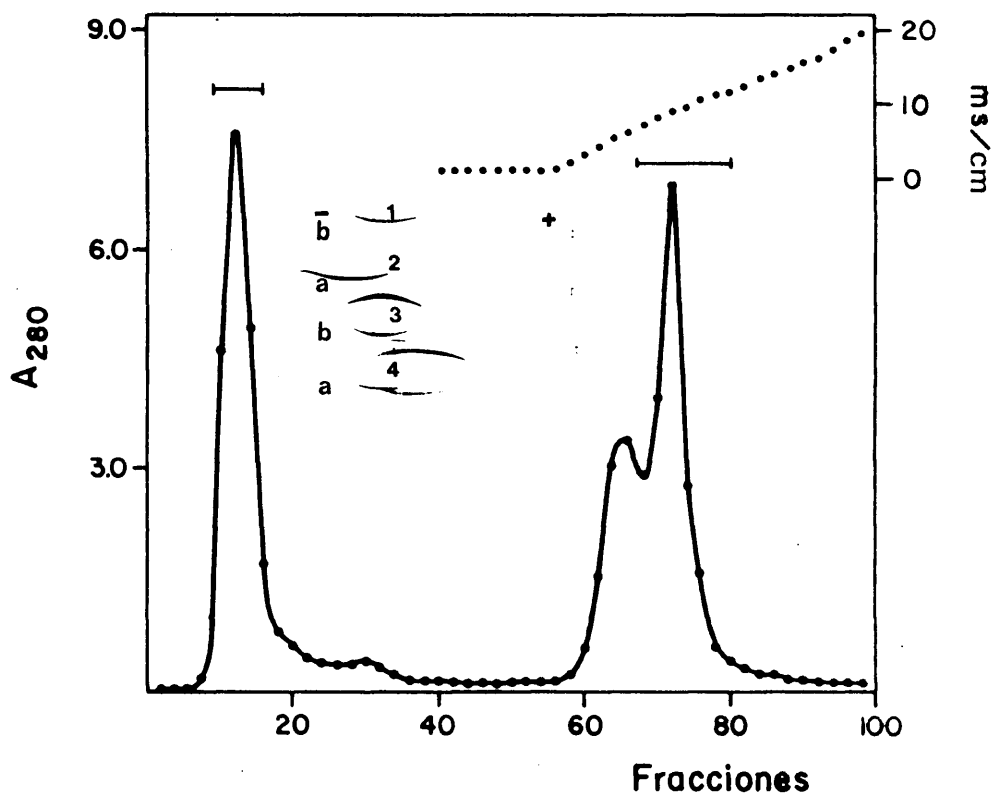


Figura II.8. Preparación de fragmentos Fab γ y Fc γ humanos. El cromatograma muestra la separación de los productos de digestión de la IgG humana con papaína (II.2.1.1.) en una columna de DEAE-Sephacel, 3 x 20 cm, equilibrada en Tris-HCl 0.04M, pH 8.0. El flujo es 100 ml/h y las fracciones de 6 ml, representándose la conductividad específica de las mismas cuando la elución se hace con un gradiente de concentración de sal (200 ml de Tris-HCl 0.04M, pH 8.0 y 200 ml del mismo tampón con NaCl 0.5M) por el trazo punteado. Se muestra también el análisis por inmunolectroforesis de las fracciones de DEAE-Sephacel conteniendo Fab γ (2) y Fc γ (4), no unida y unida, respectivamente, a la celulosa, con sueros anti-IgG (H+L), a, y anti-Fc γ , b. En (1) la IgG intacta y en (3) el pico con material retenido en la celulosa que precede al señalado con el Fc γ .

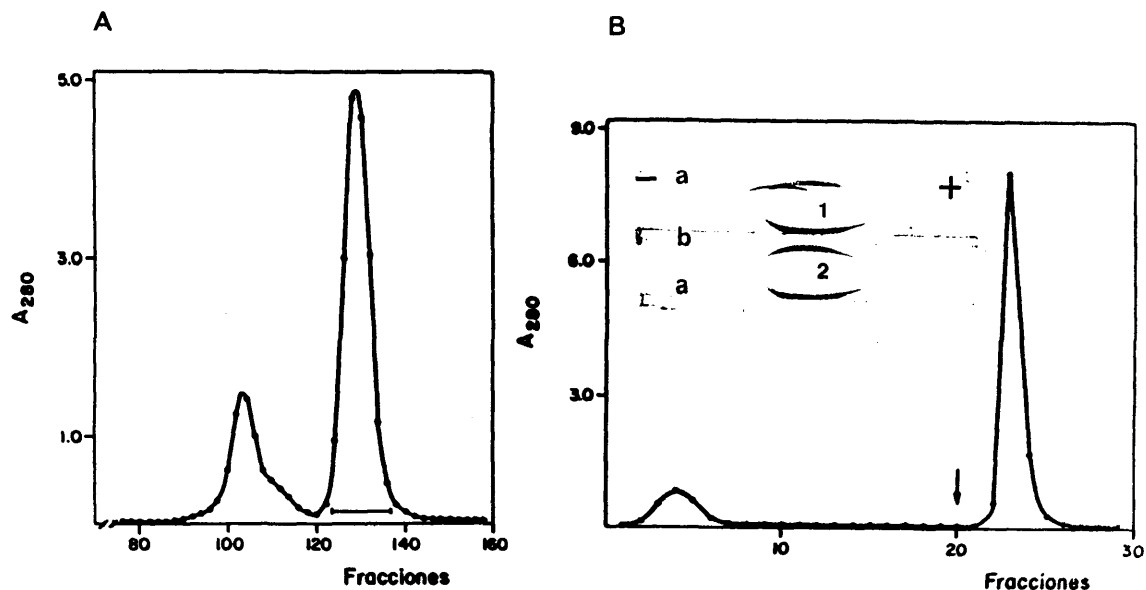


Figura II.9. Purificación del fragmento Fcγ humano.

A, filtración en una columna de Sephadex S-200, 2 x 154 cm, eluida a 30 ml/h con PBSA, de la fracción retenida en DEAE-Sephacel con Fcγ (figura II.8.). Las fracciones son de 2.5 ml y se han señalado las recogidas conteniendo el fragmento Fcγ.

B, cromatografía de las fracciones con Fcγ de la columna de Sephadex S-200 en una de PA-Sepharose, 2 x 3.3 cm, equilibrada en PBSA. Las fracciones son de 4.4 ml y el flujo de 100 ml/h. La flecha indica el inicio de la elución con Gly-HCl 0.1M, pH 2.5. Se muestra asimismo el análisis por inmunolectroforesis del Fcγ retenido en PA-Sepharose (2) y de la fracción del que es aislado por cromatografía de afinidad en esa columna (1), con sueros anti-Fcγ, b, y anti-IgG (H+L), a.

se precalienta en un baño a 37°C , y después se añade pepsina sólida, para tener una relación enzima:IgG de 1:100, en peso, agitando para acelerar su disolución. Tras incubar durante 16 horas se detiene la digestión, por inactivación del enzima, al subir el pH del medio a 7.0-8.0, con Tris sólido.

Los productos de digestión se separan en una columna de 2.4 x 154 cm de Sephacryl S-200, equilibrada y eluida con PBSA a 30 ml/h, en fracciones de 2.5 ml. El fragmento $\text{F(ab')}_2\gamma$ se halla en el pico principal, figura II.10, y como el hombro que tiene delante es IgG no digerida, se recogen los tubos señalados y se recromatografían en la misma columna, figura II.11., para disminuir al máximo la presencia de IgG, que apenas es perceptible en inmunolectroforesis,

II.2.1.3. Obtención del fragmento $\text{Fab}'\gamma$.

Se prepara a partir del $\text{F(ab')}_2\gamma$, por reducción de los enlaces disulfuro de la región gozne (Nisonoff y col., 1960). A la solución de $\text{F(ab')}_2\gamma$, 10 mg/ml en Tris-HCl 0.1M, pH 8.6, se añade DTT, con agitación y gota a gota, hasta alcanzar una concentración final de 0.2 mM. La reducción se hace a temperatura ambiente, durante 1 hora, en atmósfera de nitrógeno, finalizándose por alquilación de los grupos tioles libres con yodoacetamida 0.8mM, durante 2 horas a 4°C .

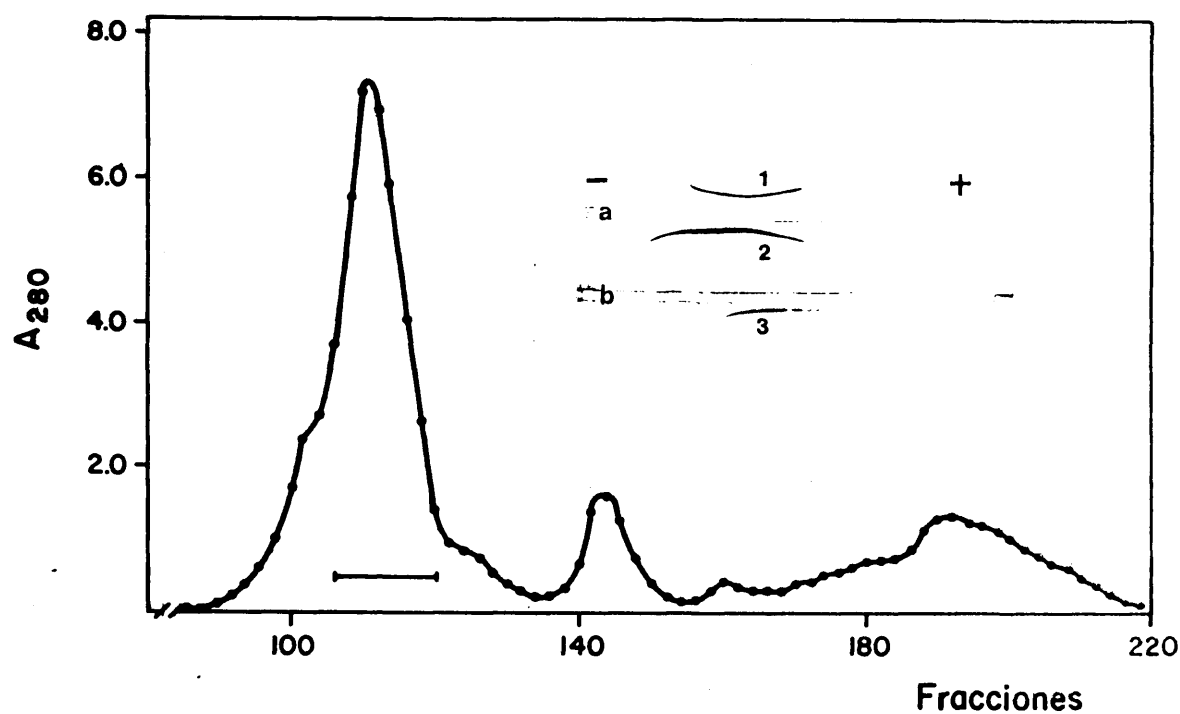


Figura II.10. Aislamiento del fragmento $F(ab')_2\gamma$ humano. El cromatograma muestra la separación de los productos de digestión de IgG humana con pepsina (II.2.1.2.) en una columna de de Sephacryl S-200, 2.4 x 154 cm, equilibrada en PBSA. El flujo es de 30 ml/h y las fracciones de 2.5 ml. Se señalan las recogidas conteniendo $F(ab')_2\gamma$. Asimismo, se muestra el análisis por inmunoelectroforesis del $F(ab')_2\gamma$ recromatografiado en la misma columna (figura II.11.) (2) con sueros anti-IgG (H+L), a, y anti-Fc γ , b. En (1) la IgG intacta y en (3) el segundo pico del cromatograma con el pFc' γ .

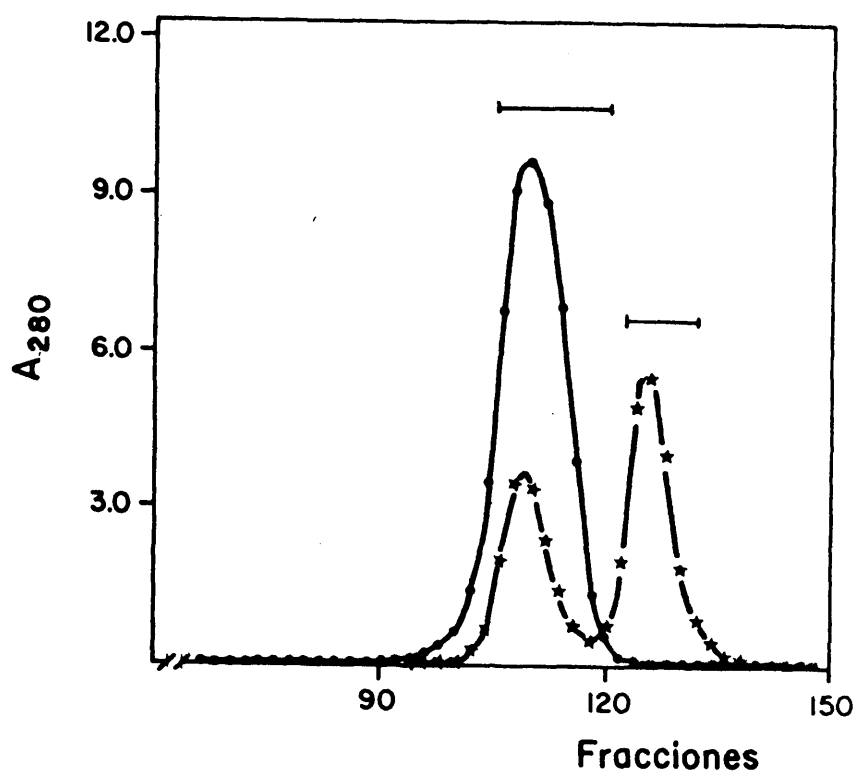


Figura II.11. Preparación del fragmento Fab' γ humano. El cromatograma muestra la separación de los productos de reducción parcial del F(ab') $_2\gamma$ (II.2.1.3.) en una columna de Sephacryl S-200, 2.4 x 154 cm, equilibrada en PBSA (*--*). El flujo es de 30 ml/h y las fracciones de 2.5 ml. Se muestra también el perfil correspondiente a la recromatografía de las fracciones conteniendo F(ab') $_2\gamma$ indicadas en el cromatograma de la figura II.10., representado por el trazo continuo.

II.2.1.4. Obtención de cadenas ligeras.

Se hace por separación, en condiciones disociantes, de los productos de reducción parcial de la molécula de IgG (Fleischman y col., 1961). A una solución de IgG, 20 mg/ml en Tris-HCl 0.5M, pH 8.1, se añade 2-mercaptoetanol, hasta una concentración de 0.1M, dejándose a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno, hasta que 90 minutos después, se enfría a 4°C y se añade yodoacetamida, a 0.15M de concentración final.

Tras 2 horas de alquilación, en nitrógeno, la solución se hace 6M en clorhidrato de guanidina y se cromatografía en una columna de 1.5 x 150 cm de Sephacryl S-300, equilibrada y eluida con clorhidrato de guanidina 6M, pH 6.5, a 12 ml/h, recogiendo fracciones de 2.5 ml.

Las cadenas ligeras se encuentran en el segundo pico del cromatograma de la figura II.12A, del que se cogen las fracciones señaladas, desechando parte del mismo, para reducir cualquier contaminación de cadenas pesadas del primer pico. Una vez dializadas contra PBSA se centrifugan para retirar lo que se ha insolubilizado, y se conservan a -20°C.

II.2.2. Fragmentos de IgM.

Todos se preparan a partir de la IgM monoclonal Iz.

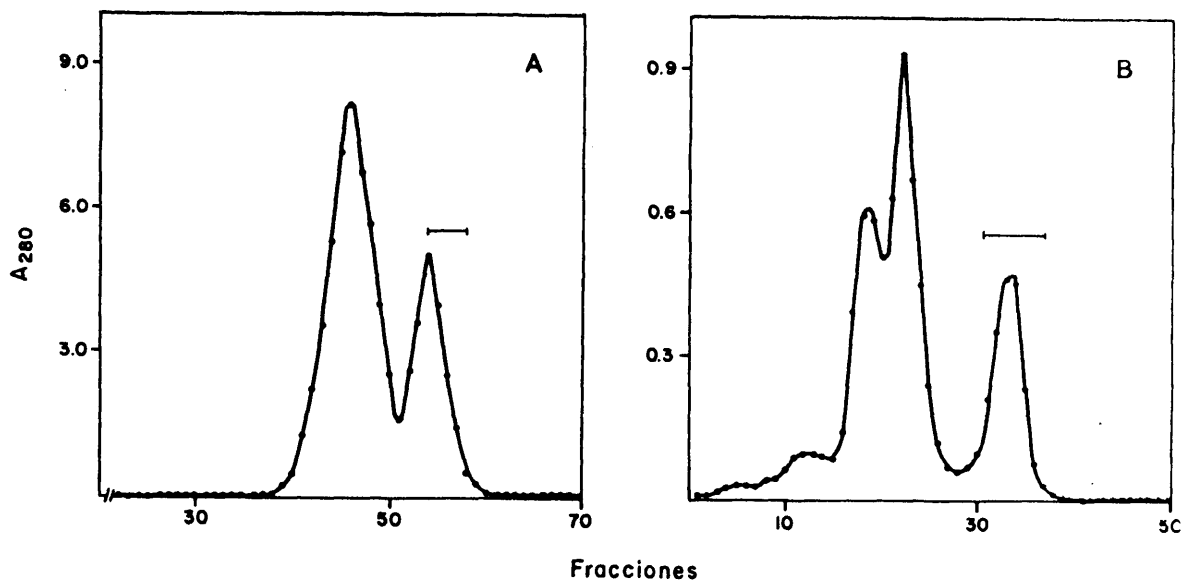


Figura II.12. Obtención de cadenas ligeras de IgG policlonal y de IgM Iz.

A, filtración de la mezcla de reducción parcial de IgG (II.2.1.4.) en una columna de Sephacryl S-300, 1.5 x 150 cm, equilibrada en fosfato sódico 0.04M, pH 6.5, con clorhidrato de guanidina 6M. El flujo es de 12.5 ml/h y las fracciones de 2.5 ml. Se indican las recogidas conteniendo cadenas ligeras.

B, filtración de la mezcla de reducción parcial de IgM Iz (II.2.2.8.) en una columna de Sephadex G-150 superfino, 1 x 40 cm, equilibrada en 5% ácido fórmico, v/v. El flujo es de 4 ml/h y las fracciones de 0.8 ml, indicándose las fracciones que contienen cadena ligera.

II.2.2.1. Obtención de los fragmentos Fab μ y (Fc) $_5\mu$.

Se producen en la digestión a alta temperatura de la IgM con tripsina (Plaut y Tomassi, 1970). La IgM, 30 mg/ml en Tris-HCl 0.05M, pH 7.6, cloruro sódico 0.12M, cloruro cálcico 0.01M y azida sódica 0.1%, p/v, se precalienta a 56°C y entonces se añade el volumen de una solución de tripsina tratada con DPCC, 1 mg/ml en clorhídrico 1mM con cloruro cálcico 1mM, que permite conseguir una relación enzima:IgM de 1:50, en peso.

Tras incubar la mezcla durante 2 horas, se añade PMSF 0.1M en dioxano, hasta una concentración final de 1 mM, para inactivar el enzima. Alternativamente, se utiliza el inhibidor de tripsina de soja, en una relación 1.5:1, en peso, de tripsina. Después de 2 horas, la solución se centrifuga 15 minutos a 10000 rpm en un rotor SS-34 de Sorvall, y el sobrenadante se cromatografía en una columna de 3.5 x 98 cm de Sephacryl S-300, equilibrada y eluida con Tris-HCl 0.05M, pH 7.6, cloruro sódico 0.12M y azida sódica 0.1%, p/v, a 40 ml/h, cogiendo fracciones de 3.8 ml.

El fragmento (Fc) $_5\mu$ se encuentra en el primer pico del cromatograma de la figura III.27., y el Fab μ en el pico principal del mismo. Las fracciones indicadas se concentran por ultrafiltración y se conservan a -20°C.

II.2.2.2. Obtención del fragmento $F(ab')_2\mu$.

Fragmentos con las características de la región $F(ab')_2\mu$ resultan en la digestión de la IgM con varios enzimas proteolíticos (Miller y Metzger, 1966; Chen y col., 1969), si bien no son idénticos, dependiendo del punto de hidrólisis en el dominio $C\mu 2$. Aquí se ha obtenido el producido en la digestión con pepsina (Kishimoto y col., 1968).

La IgM, 30 mg/ml en acetato sódico 0.1M, pH 4.5, se precalienta a 37°C antes de añadir suficiente pepsina sólida para tener una relación enzima:IgM de 1:75, en peso. Tras 7 horas, se detiene la digestión, subiendo el pH de la mezcla, con Tris sólido, a 7.0-8.0.

El digerido se cromatografía en una columna de 2.4 x 154 cm de Sephacryl S-200, equilibrada y eluida en PBSA, recogiendo fracciones de 2.5 ml, a 40 ml/h. El fragmento $F(ab')_2\mu$ se encuentra en el segundo pico del cromatograma de la figura III-35, y se conserva congelado, tras su concentración por ultrafiltración.

II.2.2.3. Obtención del fragmento $Fab'\mu$.

Al igual que el $Fab'\gamma$, se prepara a partir del correspondiente $F(ab')_2$, por reducción parcial. A una solución de $F(ab')_2\mu$, 10 mg/ml en Tris-HCl 0.25M, pH 8.6, se añade DTT 10 mg/ml en el mismo tampón, para conseguir una concentración

final de 1mM. Después de 90 minutos a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno, se finaliza la reducción con yodoacetamida 2.4mM, a 4°C, durante 2 horas.

La mezcla de reacción se dializa contra 200 volúmenes de PBSA y se cromatografía en una columna de 2 x 150 cm de Sephacryl S-200, equilibrada y eluida en PBSA a 20 ml/h, en fracciones de 2.5 ml. En estas condiciones, más del 90% del $F(ab')_2\mu$ se convierte en $Fab'\mu$, figura III.40A, que se concentra y conserva a -20°C.

II.2.2.4. Obtención del fragmento $Fc\mu$.

Se prepara por reducción parcial del $(Fc)_5\mu$ (Hester y col., 1975). A una solución de este fragmento en Tris-HCl 0.1M, pH 8.6, cloruro sódico 0.1M, se añade el volumen de Cys 0.6M que produce concentraciones finales de Cys 0.057M y 16 mg/ml de $(Fc)_5\mu$, dejándose 9 minutos a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno, añadiéndose entonces yodoacetamida hasta 0.076M, dejando la alquilación a 4°C durante 1 hora.

La mezcla de reducción se cromatografía en una columna de 2 x 150 cm, equilibrada y eluida con PBSA a 20 ml/h, en fracciones de 2.5 ml. El fragmento $Fc\mu$ eluye en las fracciones del pico principal del cromatograma de la figura III.40B.

II.2.2.5. Obtención del fragmento Fv.

La IgM Iz se digiere con pepsina, en las condiciones descritas para otras proteínas IgM monoclonales (Lin y Putnam, 1978). Una disolución de IgM, 40 mg/ml en acetato sódico 0.02M, pH 4.0, cloruro sódico 0.15M, se enfría a 4°C y se ajusta el pH. Entonces se añade pepsina sólida, para tener una relación 1:25, en peso, con la IgM, y después de 24 horas a 3-4°C, se añade más pepsina, un 40% de la cantidad inicial, continuando la proteólisis otras 20 horas más, en que se concluye subiendo el pH del medio a 7.0-8.0 con Tris sólido.

Aunque la mezcla de digestión, que estaba turbia, se aclara con el cambio de pH, se centrifuga 30 minutos a 10000 rpm, en un rotor SS-34 de Sorvall, antes de cromatografiarla en una columna de 3 x 146 cm de Sephacryl S-200, equilibrada y eluida con PBSA, para separar los productos de digestión en fracciones de 4.2 ml, a 40 ml/h.

El fragmento Fv se encuentra en el pico principal del cromatograma de la figura III.43., se concentra por ultrafiltración y se conserva a -40°C.

II.2.2.6. Obtención de los dominios V_H y V_L.

Pueden prepararse a partir del fragmento Fv, por cromatografía de intercambio iónico en condiciones disociantes (Ben-Neriah y col., 1978), pero en el caso del Fv Iz, y debido

probablemente a su débil asociación no covalente, puede conseguirse de modo similar, pero en condiciones suaves.

Así, el fragmento Fv dializado contra fosfato sódico 0.01M, pH 7.2, se cromatografía en una columna de 3 x 16 cm de CM-celulosa, equilibrada y eluida a 120 ml/h en el mismo tampón, hasta que la A_{280} de las fracciones, de 4.2 ml, es < 0.04 . La columna se eluye ahora con un gradiente de concentración lineal de sal, obtenido al mezclar 150 ml de fosfato sódico 0.01M, pH 7.2 y 150 ml del mismo tampón con cloruro sódico 0.4M. Los dominios V_H y V_L de cada pico, figura III-45, se concentran por ultrafiltración con una membrana PM10, se dializan contra PBSA y se conservan a -20°C .

II.2.2.7. Obtención de subunidades de IgM.

La IgM, 15 mg/ml en Tris-HCl 0.1M, pH 8.6, cloruro sódico 0.1M se reduce parcialmente, en atmósfera de nitrógeno, con DTT 0.2mM, a temperatura ambiente, durante 1 hora, alquilando los grupos tioles libres con yodoacetamida 1mM, durante 1 hora, a 4°C .

La mezcla de reducción se cromatografía en una columna de 3.5 x 98 cm de Sephacryl S-300, equilibrada y eluida con PBSA a 37 ml/h, recogiendo las fracciones, de 3.5 ml, que se indican en la figura III.37. y recromatografiándolas, tras su concentración, en una columna de 2 x 154 cm de Sephacryl S-200, equilibrada en PBSA. Las subunidades 7S se encuen-

tran en el segundo pico del cromatograma de la figura III.38, y se conservan a -20°C .

II.2.2.8. Obtención de cadenas ligeras Iz.

La IgM, 20 mg/ml en Tris-HCl 0.5M pH 8.2, se reduce a temperatura ambiente, durante 1 hora, con 2-mercapto-etanol 0.1M en atmósfera de nitrógeno. Después se añade yodoacetamida, concentración final 0.2M y se deja 2 horas a 4°C .

Tras diálisis contra 200 volúmenes de ácido fórmico al 5%, v/v, la mezcla se cromatografía en una columna de 4 x 96 cm de Sephadex G-150 superfino, equilibrada y eluida en ácido fórmico 5%, v/v. Las cadenas ligeras se encuentran en el último pico de cromatogramas como el de la figura II.12B, cuyas fracciones, concentradas por ultrafiltración, se dializan contra agua destilada, centrifugando 15 minutos, a 10000 rpm, en un rotor SS-34 de Sorvall, para retirar el material precipitado, y el sobrenadante se dializa de nuevo, ahora contra PBSA, conservándolo congelado a -20°C .

II.3. OBTENCION DE ANTISUEROS Y ANTICUERPOS

Se han preparado antisueros de distintas especificidades, contra inmunoglobulinas y sus fragmentos, para su caracterización y seguimiento en las etapas de su purificación, para determinaciones cuantitativas o de estructura antigénica, así como para estudios acerca de su efecto sobre la reactividad de las inmunoglobulinas con la proteína A.

El animal de donde se han obtenido es, en la mayoría de los casos, el conejo de raza neozelandés, y en otros, de la oveja.

Las diversas proteínas empleadas como antígenos son de un alto grado de pureza, superior al 90% en todos los casos, excepto cuando se trata de antisueros contra proteínas de suero, en que éste es el antígeno utilizado.

II.3.1. Inmunización de los animales.

El procedimiento de inmunización es similar para todos los antígenos, y por ello se describe de modo generalizado. Las proteínas, disueltas en fosfato sódico 0.025M, pH 7.4, o Tris-HCl 0.05M, pH 7.6, cloruro sódico 0.12M, se mezclan con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund, haciendo una emulsión de agua en aceite, por sonicación, para conseguir una pasta de consistencia semisólida, cuya calidad se comprueba al añadir una gota de la misma en un recipiente con agua, donde debe quedar en su superficie, manteniendo sus bordes definidos.

La sonicación se hace con pulsos de no más de 5 segundos, para no calentar excesivamente la mezcla. Normalmente, y para volúmenes de 3-5 ml, suelen bastar 3-4 pulsos de intensidad intermedia, espaciados entre sí 30 segundos.

Aunque, como se ha dicho, todos los antígenos se

han empleado en forma disuelta, en el caso del dominio V_H , lo ha sido como una suspensión del gel formado en su polimerización, a 10 mg/ml en fosfato sódico 0.1M, pH 7.2, en presencia de glutaraldehído 0.125%, v/v, durante 2 horas a 22°C. La finalidad de este tratamiento, es la de obtener una forma más antigénica que la que tal vez pudiera esperarse a la vista de su pequeño tamaño molecular.

Con estas emulsiones se inicia la inmunización de los animales, inyectándoles por vía intramuscular, en los cuartos traseros, alrededor de 1 ml de la misma, conteniendo 0.5-2.0 mg de antígeno, o más en el caso de las ovejas. En esta primoinoculación, el efecto del adyuvante de la respuesta inmune al antígeno considerado proviene de la presencia en la emulsión de organismos de *Mycobacterium tuberculosis*, inactivados por calor, algunos de cuyos componentes de su pared celular son particularmente estimulantes de esta reacción (Reichert y col., 1980), así como de la persistencia del antígeno en el punto de introducción, desde donde es liberado lentamente, por efecto de su atrapamiento en la emulsión en los aceites del adyuvante (Herbert, 1978).

Tres semanas después, con el animal en la fase de respuesta inmune primaria (Eisen, 1980b), se le inyectan 0.5-2.0 mg de antígeno emulsionado, como se ha descrito, pero en adyuvante incompleto de Freund, así denominado porque, a diferencia del completo, no lleva micobacterias. La inmunización

en este caso es por vía subcutánea, distribuyendo la emulsión en varios puntos del cuerpo del animal, y con cuidado de no inyectar intradérmico, para evitar la formación de úlceras.

Tras esta segunda inyección, el animal, si se ha inmunizado, debe estar en la fase de respuesta secundaria (Eisen, 1980b), caracterizada, entre otros aspectos, por la abundante producción de anticuerpos circulantes, IgG sobre todo, contra el antígeno considerado, que es la finalidad perseguida en la producción del antisuero. En todo caso, a las dos semanas se dan aún otras 2 inyecciones, espaciadas entre sí una semana, la primera como emulsión en adyuvante incompleto de Freund y la segunda en forma de disolución, conteniendo 0.2-1.0 mg de antígeno cada una, también por vía subcutánea.

El curso de la inmunización se sigue en pequeños volúmenes de sangre, extraídos periódicamente del animal, analizando el suero correspondiente por doble inmunodifusión, al observar el efecto de la dilución del mismo sobre la reacción de precipitación contra una cantidad constante de antígeno.

Si la potencia del antisuero es baja se prosigue la inmunización del animal, con inyecciones sucesivas de pequeñas cantidades de antígeno, a veces por vía intravenosa, hasta que el suero tiene una mayor capacidad precipitante, momento en que se comienza el sangrado sistemático de los animales: para los conejos, de los vasos de las orejas, 30-40 ml de sangre, una vez por semana, y para las ovejas, a partir de las venas yugulares,

unos 300 ml de sangre cada vez.

La sangre se deja coagular a temperatura ambiente, facilitando la retracción del coágulo despegándolo de las paredes del recipiente. El suero se recoge y centrifuga 10 minutos a 10000 rpm, en un rotor SS-34 de Sorvall, para retirar cualquier resto insoluble, y se guarda congelado, como mezcla de las distintas sangrías del mismo animal, a -20°C .

En este punto, inyecciones espaciadas de antígeno, cada 5-6 meses, suelen mantener el estado de inmunización de animal.

II.3.2. Absorción de los antisueros.

La finalidad de esta operación consisten en dejar los antisueros sin aquellas reactividades no deseadas desde el punto de vista de una especificidad concreta, y que se producen en el proceso de inmunización, debido a la presencia de contaminantes en las preparaciones de antígeno utilizadas o, como en este caso, por la existencia de determinantes antigénicos compartidos por las distintas clases de inmunoglobulinas, por ejemplo, los de sus cadenas ligeras.

II.3.2.1. Cromatografía de inmunoafinidad.

Las absorciones de los anticuerpos con esa reactividad no deseada se han efectuado por medio de su unión al an-

tígeno correspondiente, que se halla insolubilizado en agarosa, en un preparado que suele conocerse como inmunoabsorbente, y que permite su fácil separación del resto de los anticuerpos del suero sin reactividad contra ese antígeno, que quedan en solución (Fuchs y Sela, 1978).

En realidad, el proceso de absorción no es otra cosa que el aislamiento de anticuerpos por cromatografía de afinidad con columnas de agarosa que llevan unido el antígeno contra el que quiere dejarse sin actividad el antisuero que se absorbe. Cuando, por idéntico procedimiento, lo que se pretende es purificar anticuerpos para su posterior utilización, se dice, no que se está absorbiendo el antisuero, sino que se están aislando de él, por cromatografía de inmunoafinidad, anticuerpos de una especificidad determinada.

II.3.2.1.1. Insolubilización de antígenos en agarosa.

La naturaleza proteica de los antígenos considerados, permite su unión a agarosa que ha sido activada con bromuro de cianógeno, en un tratamiento que transforma sus grupos hidroxilo en grupos imidocarbonato y otros (Pharmacia Fine Chemicals, 1979), reactivos con nucleófilos como los grupos amino de las proteínas (Axen y col., 1967), formando enlaces covalentes tipo isoureas.

La agarosa empleada en la insolubilización de antígenos es la Sepharose 4B tratada con bromuro de cianógeno que

comercializa Pharmacia Fine Chemicals, y el procedimiento de unión de proteínas utilizado, el descrito en el boletín que acompaña el producto.

Se pesa la cantidad de Sepharose 4B necesaria, teniendo en cuenta que tras su hidratación produce 3.5 ml por gramo, aproximadamente, y se pone en un recipiente con agua acidulada a pH 3.0, 0.2 l por gramo de agarosa, durante 30 minutos. El gel se lava en un filtro de Buchner con más agua acidulada y finalmente con agua destilada. Entonces se recoge con una espátula y se pone en el tubo donde va a efectuarse la unión de antígeno.

La proteína que se va a fijar a la agarosa, disuelta en tampón bicarbonato sódico 0.1M, pH 8.8, cloruro sódico 0.5M, a una concentración de 5-10 mg/ml de gel, se mezcla rápidamente con éste, que hasta entonces no debe estar a pH básico, para evitar la pérdida de reactividad de sus grupos activos. La suspensión se tiene, bien mezclada por agitación rotatoria, durante 2 horas a temperatura ambiente. La agarosa se separa por filtración y se lava con 2 volúmenes de tampón bicarbonato, reuniendo todos los lavados. A partir de la A_{280} de los mismos puede calcularse la eficacia de la unión, que suele ser del 90-95% de la proteína utilizada.

Para asegurar que no quedan en la agarosa grupos reactivos con nucleófilos, se efectúa una segunda incubación, en presencia de exceso de los mismos, como es una solución de

etanolamina 1M, a pH 8.3 con HCl, durante otras 2 horas a temperatura ambiente, con agitación. El gel se lava de nuevo con tampón bicarbonato.

Finalmente, y con la idea de retirar de la agarosa cualquier componente no unido covalentemente, el gel se lava, alternativamente, con tampones de pH ácido y básico de alta fuerza iónica: acetato sódico 0.1M, pH 4.0 y Tris-borato 0.2M, pH 8.0, ambos con cloruro sódico 0.5M, comprobándose con cada lavado el cambio de pH.

La suspensión de agarosa con el antígeno unido se conserva en PBSA, a 4°C, utilizándose por períodos de hasta 3 años. En la tabla II.3. se muestra la relación de inmunoabsorbentes preparados.

II.3.2.1.2. Inmunoabsorción y purificación de anticuerpos.

Con los inmunoabsorbentes se hacen columnas de 10-20 ml de gel, que se manejan de modo similar a como se ha descrito para la cromatografía con PA-Sepharose (II.1.2.1.).

Para el aislamiento de anticuerpos, a partir de antisueros, de cualquier fracción de IgG o incluso de fragmentos Fab, se eluyen de la columna con un tampón glicocóla-HCl 0.1M, pH 2.5, recogién dose en tubos que contienen suficiente Tris-HCl 2.0M, pH 8.0, para su inmediata neutralización. Tras su concentración por ultrafiltración, se dializan contra PBSA y se conservan a -20°C.

Tabla II.3. INMUNOABSORBENTES UTILIZADOS

Antígenos unidos a Sepharose	Concentración
Fc γ	2.7 mg/ml
Fab μ	4.3 mg/ml
(Fc) $_{5\mu}$	2.1 mg/ml
Fab γ	2.6 mg/ml
V $_H$	2.4 mg/ml
IgG	3.5 mg/ml
L (λ)	2.0 mg/ml
L (κ)	2.9 mg/ml
PA	2.0 mg/ml

Excepto la PA-Sepharose, todos los inmunoabsorbentes se han preparado uniendo los distintos antígenos, purificados como se indica en II.1. y II.2., a Sepharose activada con bromuro de cianógeno (II.3.2.1.). La concentración expresa mg de antígeno por ml de gel, calculada como se señala en el mismo apartado.

A no ser que el material de partida exceda con mucho la capacidad de la columna, se emplean sólo los anticuerpos eluidos en una primera cromatografía; los que no se fijan o eluyen retrasados, de baja afinidad, se desechan.

En lo que se refiere a las absorciones propiamente dichas, la fracción de antisuero, anticuerpos o fragmentos Fab, según de lo que se trate, que no es retenida en la columna con el antígeno, se recoge y tras su concentración hasta el volumen original, se ensaya la presencia de la actividad que quiere retirarse, de modo que las cromatografías se suceden repetidas veces, si es necesario, hasta que ya no es detectada. La capacidad de unión de anticuerpos de la columna se restablece, tras cada cromatografía, lavando el gel con el tampón ácido disociante, comprobando la eficiencia del lavado a partir de la A_{280} del eluido, reequilibrándose en PBSA.

Los inmuoabsorbentes, tras su utilización, se conservan a 4°C , en PBSA.

II.3.3. Insolubilización de anticuerpos en agarosa.

La utilidad práctica de estos inmuoabsorbentes, como se han empleado en este trabajo, es de índole puramente cromatográfica, bien para retirar contaminantes, bien para el aislamiento de alguna proteína, pero igualmente sirven para inmunoprecipitación o radioinmunoensayos en fase sólida.

Como fuente de anticuerpos se ha usado el conjunto de IgG obtenida del antisuero por precipitación con sulfato sódico (Heide y Schwick, 1978), que se añade sólido hasta una concentración del 18%, p/v. La proteína insoluble tras 1 hora a temperatura ambiente, se recoge por centrifugación de la suspensión a 8000 rpm, durante 20 minutos, en un rotor SS-34 de Sorvall, a 30°C (a temperatura baja cristaliza la sal).

El sedimento se disuelve en agua destilada y se dializa contra 300 volúmenes de tampón de fijación de proteínas a agarosa (II.3.2.1.1.), con agitación, durante toda la noche, siguiendo a continuación todos los pasos descritos en la insolubilización de antígenos.

De este modo se consiguen inmunoabsorbentes más estables que los preparados immobilizando sólo los anticuerpos específicos, y el fraccionamiento con sulfato sódico elude el problema que puede representar la presencia de iones amonio, reactivos con la agarosa activada con bromuro de cianógeno, si se hubiera utilizado sulfato amónico.

II.3.4. Obtención de fragmentos Fab de anticuerpos IgG.

El empleo de anticuerpos en el estudio de la reactividad de inmunoglobulinas con proteína A, precisa la utilización de fragmentos con actividad anticorpál sin su región Fc γ , ya que al ser de conejo y reaccionar con la PA (Forsgren y Sjoquist, 1967), podrían afectar la interacción estudiada por

otro motivo que el solo bloqueo de sitios antigénicos, que es el efecto buscado. Por esta causa todos estos experimentos se han efectuado con los correspondientes fragmentos Fab.

La preparación de estos fragmentos se hace a partir de la mezcla de digestión de la IgG con papaína (Porter, 1959). La IgG, obtenida por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose (II.1.2.1.), se disuelve en fosfato sódico 0.1M, pH 7.0, con Cys 10mM y EDTA 2mM. Cuando la solución está a 37°C se añade suficiente papaína sólida para tener una relación enzima:IgG de 1:100, en peso, dejándola durante 16 horas, momento en el que la digestión se detiene inactivando el enzima con yodoacetamida, a una concentración final de 0.015M, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Como la IgG no digerida y los fragmentos Fc γ producidos tienen afinidad por la PA, al cromatografiar el digerido de IgG en PA-Sepharose, los fragmentos Fab se recogen en las fracciones del eluido correspondiente a lo no unido a la columna, teniendo cuidado de no haber saturado su capacidad. Después de concentrarse se dializan contra PBSA, para retirar la yodoacetamida y poder estimar su concentración por A₂₈₀.

La figura II.13. muestra un cromatograma representativo de este procedimiento de aislamiento de fragmentos Fab, así como el análisis por SDS-PAGE del fraccionamiento en PA-Sepharose de la mezcla de digestión con papaína de los anticuerpos IgG de conejo.

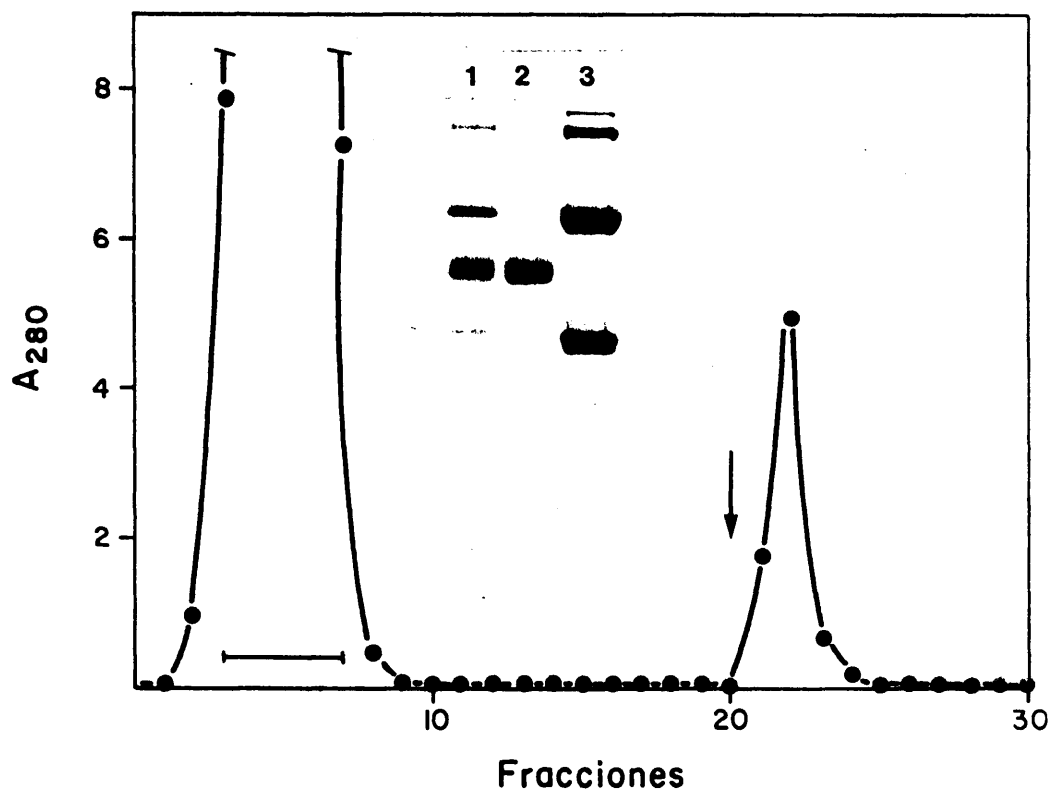


Figura II.13. Aislamiento de fragmentos Fab de anticuerpos IgG de conejo. El cromatograma muestra la separación de los productos de digestión con papaína de los anticuerpos previamente purificados (II.3.4.) en una columna de PA-Sepharose, 2 x 3.3 cm, equilibrada en PBSA. El flujo es de 100 ml/h y las fracciones de 4.8 ml. La flecha indica el inicio de la elución con citrato sódico 0.1M, pH 2.5. Se señalan las fracciones recogidas conteniendo Fab y su análisis por SDS-PAGE, en un gel de 5.3%C y 9%T, (2), junto con el de la mezcla de digestión cromatografiada (1) y el del material retenido en PA-Sepharose (3).

II.3.4.1. Obtención de fragmentos Fab anti-proteína A.

En un caso, el procedimiento general antes descrito no puede utilizarse, y es el de los anticuerpos anti-PA, ya que los fragmentos Fab con actividad contra la PA quedan retenidos en la columna de PA-Sepharose.

Por ello se purifican por cromatografía de intercambio iónico, en una columna de CM-celulosa, figura II.14A, equilibrada en acetato sódico 0.05M, pH 5.5. De este modo, tanto la IgG como los fragmentos Fc γ se fijan a la celulosa, a diferencia de los Fab, que así se obtienen en las fracciones que eluyen de la columna en el tampón de equilibrado.

Cuando de esta preparación de Fab se quieren aislar los fragmentos con actividad contra la PA, se cromatografían en la columna de PA-Sepharose, figura II.14B., de donde son eluidos con un tampón ácido, como se ha descrito en II.1.2.1..

II.4. TECNICAS DE INMUNOPRECIPITACION EN GEL

En la mezcla de un antisuero y su correspondiente antígeno, y como consecuencia de la unión de los anticuerpos a sus distintos epitopos, se producen agregados precipitables como aspecto destacado de la interacción secundaria que sigue a la reacción antígeno-anticuerpo (Kabat y Mayer, 1961).

La formación de estos inmunoprecipitados depende

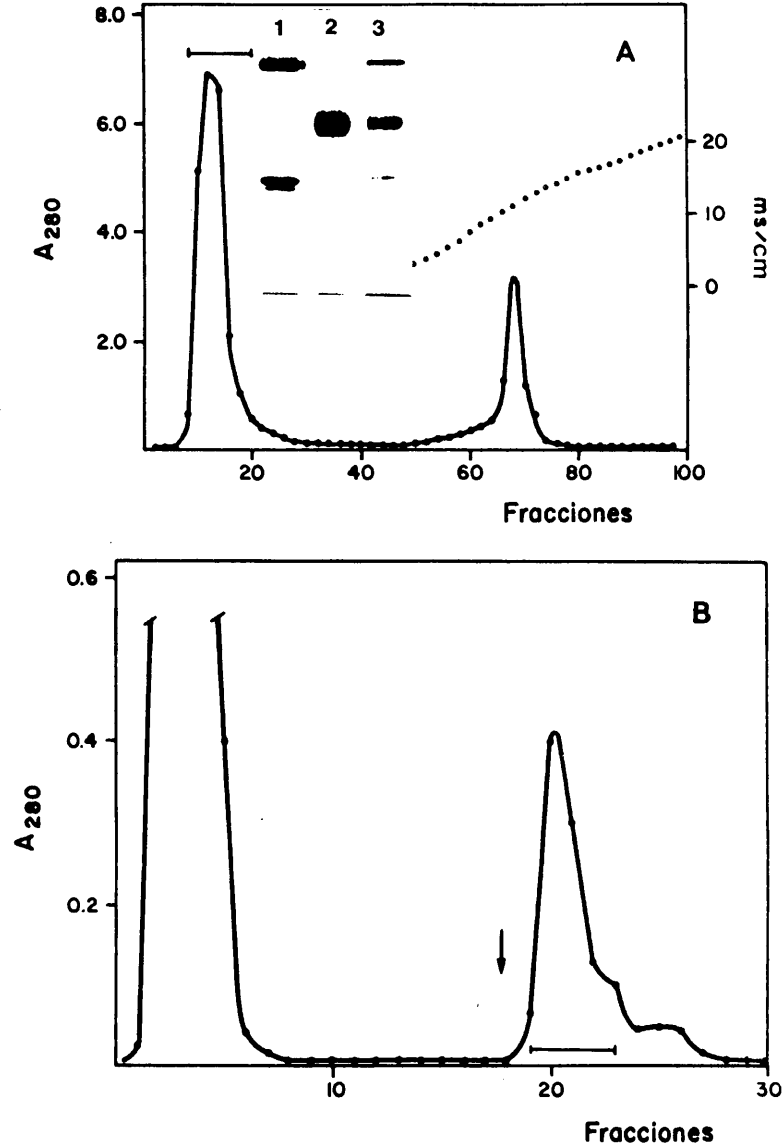


Figura II.14. Aislamiento de fragmentos Fab monoespecíficos anti-proteína A.

A, separación de los productos de digestión con papaína de anticuerpos IgG anti-PA (II.3.4.) en una columna de CM-celulosa, 3 x 15 cm, equilibrada en acetato sódico 0.05M, pH 5.5. El flujo es de 100 ml/h y las fracciones de 6 ml. Se indica la conductividad específica de las mismas cuando la elución se hace con un gradiente de concentración de sal (200 ml de acetato sódico 0.05M, pH 5.5 y 200 ml del mismo tampón con NaCl 0.4M). Las fracciones señaladas contienen los fragmentos Fab, como se observa en el análisis por SDS-PAGE, en un gel de 5.3% y 9%T, del material unido (1) y no unido (2) a la celulosa, junto al del digerido de IgG (3).

Figura II.14. (continuación)

B, cromatografía de Fab de IgG de conejo anti-PA en una columna de PA-Sepharose, 2 x 3.3 cm, equilibrada en PBSA. El flujo es de 100 ml/h y las fracciones de 3.7 ml. La flecha indica el inicio de la elución con citrato sódico 0.1M, pH 2.5, señalándose las fracciones recogidas con los fragmentos con actividad anti-PA.

fundamentalmente de la relación en la que se combinan ambos elementos (Kabat y Mayer, 1961), siendo la ventaja principal que aportan los métodos de inmunodifusión en medios gelificados, el que tal relación se encuentra a partir del gradiente de concentración de antígeno y anticuerpo que se produce en el gel, generalmente de agarosa, por su difusión desde un punto del mismo.

Hay diversas técnicas de inmunodifusión (Ouchterlony y Nilsson, 1978), de acuerdo con la disposición adoptada para la difusión de antígeno y anticuerpo, siendo de utilización común aquellas en que ocurre en dos dimensiones, que según que el gradiente de concentración se establezca para uno o para los dos reactivos, recibe el nombre de inmunodifusión simple y doble, respectivamente.

La asociación de estos procedimientos de inmunodifusión con la electroforesis, determina los distintos métodos inmunolectroforéticos, de los que la inmunolectroforesis y la inmunolectroforesis cruzada, que se han empleado aquí, se describen en II.5.1..

II.4.1. Inmunodifusión doble en dos dimensiones.

La inmunodifusión se hace en láminas de gel, según la técnica de Ouchterlony (Ouchterlony, 1958), que se preparan vertiendo con una pipeta precalentada alícuotas de una suspensión de agarosa al 1%, p/v, en Tris-HCl 0.01M, pH

7.8, cloruro sódico 0.15M y azida sódica 0.1%, p/v, fundida en un baño de agua hirviendo hasta su completa transparencia, sobre láminas de vidrio o sobre la cara hidrófila de una hoja de poliester (GelBond), colocadas en una superficie horizontal, de modo que la capa de gel que se forma tiene un espesor de 0.15 cm.

Cuando la solución de agarosa se ha enfriado, a temperatura ambiente, las placas se ponen en cajas con papel de filtro humedecido en su fondo, y se meten en la nevera, para concluir el proceso de gelificación, a 4°C, hasta su consistencia definitiva.

En ocasiones se incluye PEG 6000 en el gel, para facilitar la formación de inmunoprecipitados (Johanssen y col., 1980), lo que se hace añadiéndolo sólido a la solución de agarosa previamente fundida, quedando al 3%, p/v.

En esta lámina de gel, los antígenos y antisueros se colocan en pocillos circulares que se excavan en la misma con ayuda de cortadores de diámetro apropiado, extrayendo el correspondiente trozo de agarosa por aspiración con una pipeta Pasteur conectada a una fuente de vacío. El tamaño de los pocillos, así como su distancia y disposición relativas, se tallan de acuerdo con un patrón que se dibuja previamente en una hoja de papel milimetrado.

La inmunodifusión se hace a temperatura ambiente,

en las cajas húmedas citadas, durante 24-48 horas. La inmunoprecipitación resultante, que da información esencialmente cualitativa, se conserva por fotografía de la lámina de agarosa o por secado y teñido de la misma.

Si el gel va a fotografiarse se dispone en un cajón que permite su iluminación oblicua, sobre un fondo oscuro, y si va a teñirse, se sumerge en un recipiente con PBSA, para retirar todas las proteínas no precipitadas.

Una vez lavadas, 24 horas suelen ser suficientes, el gel se cubre con una hoja de papel de filtro (Whatman, n^o 1), cuidando que los pocillos estén llenos de agua, y se seca sobre más papel de filtro, poniendo un peso de 1-2 kg encima. Cuando la mayoría del líquido se ha extraído del gel, se termina de secar con la corriente de aire de un secador de pelo.

Ahora se separa la hoja de papel de filtro y la placa de vidrio o la lámina de poliéster se introducen en una solución de CBB G-250 0.5%, p/v, en metanol: ácido acético: agua (45:10:10), durante 5 minutos. A continuación se lavan en el mismo disolvente, para retirar el exceso de colorante no unido a proteínas y, finalmente, se secan.

II.4.2. Inmunodifusión radial simple.

En este procedimiento de inmunodifusión, el gel donde se produce la inmunoprecipitación contiene uno de los

dos reactivos, por lo que solamente difunde uno de los componentes del sistema antígeno-anticuerpo y, por ello, se hace de inmunodifusión simple.

La peculiaridad del método estriba en sus posibilidades cuantitativas, al permitir establecer una relación entre el tamaño del precipitado, que en este caso es de forma circular, y la concentración del elemento que difunde (Mancini y col., 1965).

Debido a la naturaleza cuantitativa del método que observar algunas precauciones en la preparación de la lámina de gel. Se emplea la misma agarosa que para inmunodifusión doble y cuando está completamente fundida, se pone en un baño a 56°C, temperatura a la que la suspensión se conserva fluida y que se aprovecha para incluir uno de los reactivos, generalmente el antisuero, al 2-4%, v/v, que precipitaría a temperaturas superiores.

Asegurada una mezcla homogénea del antisuero con la agarosa, un volumen de esta suspensión se vierte en una cajita de poliestireno (Miles) que permite obtener láminas de espesor uniforme, 0.15 cm, incluso en sus bordes, lo que es importante para que no se distorsionen en esa zona los resultados de precipitación.

El tallado de los pocillos se hace con la precaución de no despegar la lámina de gel del plástico soporte,

y al verter en ellos las soluciones de antígeno se procura que queden llenos.

La inmunodifusión se deja a temperatura ambiente, como mínimo 48 horas, para que el tamaño de los precipitados se estabilice, momento en que las placas se fotografían y se hace una medida del tamaño del halo, como su diámetro o el peso de papel de superficie igual a la del círculo limitado por la línea de precipitación.

En la misma lámina de agarosa se incluyen pocillos que se llenan con diluciones sucesivas de una solución de concentración conocida de antígeno, que así sirve como referencia para estimar la cantidad de antígeno presente en la solución ensayada. Esto se hace gráficamente, a partir de la línea recta que resulta al representar el logaritmo de cada una de esas concentraciones conocidas, frente al tamaño medido de los correspondientes halos de precipitación (Mancini y col., 1965).

Habitualmente los geles son de agarosa al 1%, p/v, pero cuando el antígeno que difunde es voluminoso, con coeficientes de difusión bajos, como la IgM, se hace en geles con 0.6% agarosa, p/v, para que no se alargue excesivamente el tiempo de inmunodifusión.

II.5. TECNICAS ELECTROFORETICAS

Se basan en la movilidad que adquiere en el seno

de un campo eléctrico cualquier macromolécula con carga, y dependiendo de los medios y condiciones que se empleen, resultan las distintas técnicas desarrolladas.

II.5.1. Electroforesis en agarosa.

La utilización de soportes que estabilicen el medio de electroforesis determina una resolución más eficaz de los distintos elementos de una mezcla que se separan por este procedimiento, al evitar la formación de corrientes de convección y dificultar la libre difusión de sus componentes.

En el caso de los geles de agarosa, el entramado constituido por la estructura terciaria de la molécula de agarosa (Arnott y col., 1974) determina poros tales que partículas del tamaño de las proteínas pueden migrar a su través sin dificultad, por lo que la separación que se consiga se deberá, esencialmente, a la densidad de carga de cada proteína en el tampón utilizado.

Aquí se han empleado geles de agarosa de baja electroósmosis (la presencia de algunos restos aniónicos en la agarosa determina el movimiento, durante la electroforesis, de contraiones, con su agua de hidratación asociada, hacia el cátodo; este flujo de líquido se denomina electroósmosis, y se mide por el índice $-m_p$, o cociente entre la distancia migrada por un dextrano neutro y la distancia entre

él y la migrada por una molécula aniónica como la albúmina, tras electroforesis en condiciones determinadas (FMC corporation, 1982)). Con esta agarosa, al 1%, p/v, en glicocola 0.2M y Tris 0.068M, pH 8.6, se preparan láminas de 0.1 o 0.2 cm de espesor, sobre hojas de poliester de 11 x 12.5 cm y placas de vidrio de 12 x 8 cm, como se ha descrito para los geles de inmunodifusión, con la salvedad de que la gelificación se hace con dientes de poliacetato incluidos verticalmente, de modo que al sacarse, una vez endurecida la suspensión, quedan excavados pocillos de forma rectangular, generalmente de 0.8 o 1.5 cm de longitud, en los que se aplica la muestra que va a analizarse. La posición de estos pocillos en la lámina de agarosa viene determinada por la movilidad esperada para los distintos componentes, estando, en general, más próxima al borde donde se localiza el cátodo.

La electroforesis se hace horizontalmente, aplicando un campo constante de 8V/cm, durante el tiempo necesario para que un pequeño volumen de una solución de azul de bromofenol al 0.01%, p/v, utilizado como marcador de movilidades, alcance el ánodo.

El contacto del gel de agarosa con el tampón glicocola 0.1M y Tris 0.034M, pH 8.6, donde están los electrodos, se hace a través de hojas de papel Whatman 3MM.

El resultado de la electroforesis se determina por tinción de las proteínas, para lo que es necesario haberlas

fijado previamente, por inmersión del gel, nada más terminada la electroforesis, en una solución de 5% TCA, p/v, y 3.5% ácido sulfosalicílico, p/v, en 38% metanol, v/v, durante 20 minutos. Después el gel se seca y tiñe con la solución de CBB G-250, como se ha descrito en II.4.1..

II.5.1.1. Inmunoelectroforesis.

En esta técnica (Grabar y Williams, 1953), los pocillos donde se disponen 10-30 μ l de las soluciones de antígeno, se tallan con los mismos cortadores utilizados en inmunodifusión, equidistantes sobre una línea perpendicular a la dirección del campo eléctrico. Asimismo, y entre esos pocillos, se corta el gel con un bisturí, delimitando lo que serán los bordes de surcos de 0.2 x 8 cm, sin extraer la correspondiente tira de agarosa.

Concluida la electroforesis, las placas se introducen en cajas húmedas, donde los surcos excavados se llenan con 0.15-0.25 ml de los antisueros apropiados. La inmunodifusión se deja, a temperatura ambiente, durante 24-48 horas y los resultados se registran fotográficamente o por secado y teñido del gel.

II.5.1.2. Inmunoelectroforesis cruzada.

Es una técnica en dos pasos, donde a la separación electroforética de la muestra sigue su inmunoprecipitación

que a diferencia de lo que ocurre en inmunoelectroforesis, se produce en otro gel que lleva incluido el antisuero, y en el que se introducen los antígenos en una segunda electroforesis, en dirección perpendicular a la primera (Laurell, 1972).

Tras electroforesis de la muestra, como se indica en II.5.1.1., se cortan tiras de gel 0.5 x 10 cm, comprendiendo el centro del pocillo de aplicación, por lo que así contiene los distintos componentes separados, y se introduce en otro gel de agarosa con 3% antisuero, v/v, preparado como II.4.2., pero en tampón de electroforesis (II.5.1.1.), en el que se ha excavado, cerca de uno de sus extremos, un canal de igual tamaño, ligeramente más estrecho, para un encaje ajustado que no deje burbujas de aire entre ambos geles.

Ahora se hace otra electroforesis, aplicando un potencial constante de 2-3V/cm, durante 14-16 horas, con el cátodo del lado de la placa en que se ha incluido la tira de agarosa y en dirección perpendicular a la primera separación. En estas condiciones los anticuerpos presentes en el gel apenas se mueven, y al unirse a los antígenos que avanzan en él, forman las líneas de precipitación que se conservan por tinción de las placas, como en II.4.1..

El resto del gel donde se ha efectuado la electroforesis en la primera dimensión se tiñe también (II.5.1.),

para relacionar el patrón obtenido con el correspondiente de inmunoprecipitación.

II.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

El mejor control de las propiedades mecánicas de la matriz de electroforesis, junto con la posibilidad de conseguir tamaños de poro mucho más pequeños que los de los geles de agarosa, permitiendo la separación de proteínas de similar densidad de carga, por diferencias en su tamaño, hace de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) una técnica con un poder de resolución muy superior a la efectuada en otros soportes (Davis, 1964).

El gel de poliacrilamida se produce en la polimerización de acrilamida en cadenas lineales que son entrelazadas por N-N'-metilenbisacrilamida, u otra sustancia equivalente, formando un entramado dependiente de las cantidades relativas de ambos monómeros. Así, las propiedades del gel vienen determinadas por la concentración total de monómero, como porcentaje p/v o índice T y por la de agente de entrecruzamiento, como fracción del total o índice C (Hjerten, 1962). La polimerización es catalizada por N-N-N'-N'-tetrametiletildiamina, sobre el que se añaden moléculas de acrilamida al iniciarse la reacción en presencia de una fuente de radicales libres.

II.5.2.1. Electroforesis en un sistema de tamponamiento discontinuo.

La elección de unas condiciones de pH y concentraciones de electrolitos en las que las proteínas que se analizan adquieren movilidad unidireccional, por ejemplo, anódica, de magnitud comprendida entre la de los aniones de sendos tampones diferentes, permite mejorar su resolución electroforética, al aprovechar las posibilidades del efecto zonal resultante en la concentración de la muestra, previamente a su separación, en una estrecha franja, como ocurre en el sistema discontinuo de Davis y Ornstein (Ornstein, 1964; Davis, 1964), que es el utilizado aquí.

El gel de poliacrilamida utilizado es una lámina rectangular de 0.15 cm de espesor y 10 cm de longitud, con una zona inferior de separación, de 8-9 cm y otra superior, más blanda, de 1.5 cm, donde se aplica y concentra la muestra.

Las mezclas de polimerización, preparadas a partir de los volúmenes apropiados de soluciones de acrilamida y metilenbisacrilamida al 20%, p/v, en agua, y de los correspondientes tampones concentrados, se desgasean en un kitasato conectado a una fuente de vacío, antes de añadir el catalizador, 0.0125% TEMED, v/v, e iniciador, 3.75 μ l de persulfato amónico al 20%, p/v, por cada ml de mezcla.

El borde superior de solución de gel separador, que está en tampón Tris-HCl 0.75M, pH 8.9, se cubre con una delgada capa de agua, que se quita una vez producida la polimerización de la acrilamida. Entonces se añade la solución del gel concentrante, en tampón Tris-HCl 0.062M, pH 6.7.

Las muestras, conteniendo 5-10 μ g de proteína por banda, se mezclan con un volumen igual de tampón de gel superior que tiene 10% glicerol, v/v y 0.01% azul de bromofenol, p/v, en no más de 100 μ l.

La electroforesis se hace en un aparato similar al diseñado por Studier (Studier, 1973), aplicando un campo constante de 50V hasta que el marcador de azul de bromofenol se introduce en el gel inferior, y después se sube a 100-120V, hasta que llega a 1 cm del borde. Los compartimentos con los electrodos tienen un tampón Tris 0.05M-glicocola 0.387M, pH 8.3.

Concluida la electroforesis, el gel se tiñe, a temperatura ambiente, en una solución de 0.4% CBB R-250, p/v, en 3.5% ácido perclórico, v/v (Reisner y col., 1975), lavando el exceso de colorante con 10% ácido acético, v/v, antes de fotografiarlos.

Si en lugar de láminas se emplean cilindros de poli-acrilamida, la polimerización se hace en tubos de vidrio de 0.8 x 10 cm, y el gel superior se sustituye por una solución

de sacarosa al 50%, p/v, en la que se incluye la muestra, en tampón de pH 6.7, que ha de contener una mayor cantidad de proteína, debido al aumento de la sección del gel.

Los geles se extraen de los tubos. al final de la electroforesis, inyectando con una jeringuilla agua destilada, desde una aguja introducida entre el gel y la pared del tubo, tiñéndolos, a continuación, como se ha descrito antes.

II.5.2.2. Electroforesis en presencia de SDS.

La inclusión del detergente aniónico SDS en los tampones de electroforesis, tiene el efecto de regular la separación de las distintas proteínas por su tamaño, ya que sus posibles diferencias de carga quedan enmascaradas en la carga negativa que adquieren al recubrirse de detergente, y la densidad de carga resultante es similar para todas, al ser constante la relación SDS:proteína (Dunker y Kenyon, 1976).

En este caso, se utiliza un sistema discontinuo de tamponamiento similar al descrito del modo en que se ha modificado para su utilización con SDS (Laemmli, 1970), que queda así: gel inferior, Tris-HCl 0.375M, pH 8.3, gel superior, Tris-HCl 0.125M, pH 6.8 y tampón de electrodos Tris 0.025M-glicocola 0.192M, pH 8.3, todos con 0.1% SDS, p/v.

Esta técnica permite el cálculo de pesos moleculares, al existir una relación lineal entre las movilidades

electroforéticas de las proteínas y el logaritmo de sus pesos moleculares (Saphiro y col., 1967), para lo que se construye una recta patrón, a partir de los resultados obtenidos con proteínas de peso molecular conocido. Las utilizadas aquí, con sus pesos moleculares (del catálogo de la casa comercial), entre paréntesis, son: IgG humana (150000), conalbúmina (86000), seroalbúmina bovina (67000), subunidades de catalasa (62000), anhidrasa carbónica (29000), inhibidor de tripsina de soja (21000), lisozima (14000) y cadena β de insulina (5700).

Las muestras, en tampón Tris-HCl 0.0625M, pH 6.8, con 1% SDS, p/v, 10% glicerol, v/v y azul de bromofenol, se calientan 5 minutos en tubos inmersos en agua hirviendo.

Cuando las proteínas se estudian con sus puentes disulfuro completamente reducidos, el tampón de muestra incluye 5% 2-mercaptoetanol, v/v o, alternativamente, DTT 0.15M, alquilando después las muestras con yodoacetamida en 10% exceso molar de grupos tioles, durante 30 minutos, a temperatura ambiente, ajustando el pH con hidróxido sódico.

La electroforesis se hace de igual modo que en II.5.2.1., y al finalizar los geles se tiñen en una solución de 0.25% CBB R-250, p/v, en metanol: acético: agua (45: 10: 10) (Weber y Osborn, 1969), destiñendo en la misma solución sin colorante.

Si las muestras son radiactivas, los geles se secan sobre una hoja de papel de filtro, Whatman 3MM, con vacío y calefacción suaves, para que no se rompan, autorradiografiándose en chasis sin pantallas intensificadoras, con películas Kodak X-Omat S y Kodak X-Omat MA, que se procesaron en equipos de revelado automático de Kodak o Agfa.

II.5.3. Isoelectroenfoque.

En esta técnica, las proteínas se separan en un medio en el que se ha establecido un gradiente estable de pH, por electroforesis de moléculas de anfólitos de bajo peso molecular con distintos puntos isoeléctricos y fuerte capacidad tamponante, a través del que migran hasta que alcanzan una zona de pH en la que son eléctricamente neutras y cesa su movilidad (Vesterberg y Svensson, 1966).

El interés principal de los soportes de electroforesis en este caso, es la ausencia de cargas, y por ello se utilizan geles de poliacrilamida y, más recientemente, de agarosa sin electroósmosis, para minimizar la deriva de los gradientes de pH causada por el flujo electroosmótico generado durante la electroforesis.

II.5.3.1. Isoelectroenfoque en agarosa.

Los geles se preparan fundiendo una suspensión de agarosa, $-m_r = 0$, en agua destilada, que cuando está totalmen-

te fluida se deja enfriar a 65°C y entonces se añade una solución de anfolitos, intervalo pH 3.5-10.0, de manera que al completar con más agua destilada, su concentración queda al 3%, v/v, y la de la agarosa al 1%, p/v.

Con una pipeta precalentada se ponen 12 ml de la suspensión en una lámina de poliéster de 11 x 12.5 cm y se deja gelificar, como en II.4.1., cuidando de que no se condense agua en la superficie del gel.

1-2 μl de las muestras, 2-5 $\mu\text{g/ml}$, se aplican en las perforaciones rectangulares de una tira de poliacetato, colocada sobre el gel, cerca de su mitad.

La electroforesis, con los electrodos situados directamente sobre el gel de agarosa, que se halla sobre una placa refrigerada con agua a 10°C , se inicia a una potencia máxima de 1W. A los 10 minutos, se detiene, se quita la tira de aplicación de muestras y se prosigue, fijando el campo a 1.5 kV, hasta que la conductividad del sistema, que disminuye conforme avanza la electroforesis, empieza a estabilizarse.

Incluyendo en el mismo gel proteínas de punto isoelectrico conocido, puede estimarse el de la proteína que se estudia. Aquí se han utilizado citocromo c, pI = 10.0 (Barlow y Margoliash, 1966), quimotripsinógeno A, pI = 9.2-9.6 (Malamud y Drysdale, 1978) y mioglobina, pI = 7.2-7.6 (Malamud y Drysdale, 1978). Finalizado el isoelectroenfoque, el gel se fija (II.5.1.) y se tiñe con CBB R-250 (II.5.2.2.).

II.6. MARCAJE RADIOACTIVO DE PROTEINAS

La incorporación de un radioisótopo en la molécula de la proteína considerada, permite efectuar cómodamente estudios cuantitativos de gran sensibilidad. Por la alta radiactividad específica y la sencillez de su manejo, el ^{125}I es el radioisótopo más utilizado en el marcaje de proteínas.

Los distintos métodos de marcaje desarrollados se basan en la preparación de I^+ , a partir del correspondiente yoduro, en presencia de un agente oxidante, como las clorámidas o el peróxido de hidrógeno (Greenwood y col., 1963; Marchalonis, 1969), que a pH 7-8, en una reacción de ataque electrófilo, se une al anillo de las tirosinas, fundamentalmente y, en menor extensión, al de las histidinas (Krohn y col., 1977).

II.6.1. Yodación con IodoGen.

El empleo de 1,3,4,6-tetracloruro-3 α ,6 α difenilglicoluril (IodoGen es su nombre comercial) en lugar de clorámidas solubles en tampones acuosos, como la cloramina T, resulta en un menor riesgo de modificación química de la proteína que se va a marcar, no sólo por la minimización de su oxidación, sino por lo innecesario de tratamientos reductores para la finalización de la reacción de marcaje (Fraker y Speck, 1978).

Para la yodación se preparan tubos de vidrio, 12 x 75 mm, en los que se ha secado con nitrógeno, el día anterior, una solución de IodoGen, 0.1 mg/ml, en cloroformo. Por otro lado, 10- 50 µg de proteína, en tampón 0.1M fosfato sódico, pH 7.4, se mezclan con 0.1-0.5 mCi de ^{125}I Na. en tubos de polipropileno, en un volumen final de 0.1 ml.

El marcaje se inicia cuando 95 µl de la solución de proteína se ponen en tubos con 2-4 µg de Iodogen, uniformemente distribuido en su fondo. La reacción ocurre a temperatura ambiente, con agitación ocasional, hasta que 5 minutos después, 90 µl de esta solución se transfieren a un tubo de polipropileno que contiene 50 µl de tirosina, 1 mg/ml, en PBSA, para consumir el $^{125}\text{I}^+$ residual, y al que se añaden después 50 µl de yoduro potásico, 10 mg/ml, en PBSA.

La proteína marcada se recupera de la mezcla de reacción al cromatografiar 180 µl de la misma en una columna de Bio-Gel P-4, de 0.8 x 20 cm, equilibrada en PBSA con BSA, 1 mg/ml, para disminuir su adsorción al gel. De las fracciones recogidas, de 0.5 ml, las correspondientes al volumen excluido contienen la proteína- $\{^{125}\text{I}\}$ en tanto que la tirosina marcada y otros productos radiactivos de bajo peso molecular eluyen después.

El material así marcado se conserva a -40°C , en alícuotas de 50 µl.

II.6.2. Yodación enzimática.

En este procedimiento de marcaje, también muy suave, la oxidación del yoduro resulta de la actuación de la lactoperoxidasa oxidasa (LPO) sobre la pequeña cantidad de peróxido de hidrógeno que, en otra reacción simultánea, está produciendo la glucosa oxidasa (GO) en la oxidación de la glucosa (Hubbard y Cohn, 1975).

En un tubo de polipropileno se mezclan 50 µg de la proteína que va a marcarse, 1 µg de LPO y 0.05 µg de GO, disueltas en 0.1M fosfato sódico, pH 7.3, con 0.2 mCi de ^{125}INa . La reacción, en un volumen no superior a 100 µl, se inicia al añadir 25 µg de glucosa, disuelta en el mismo tampón.

Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detiene con 50 µl de 0.2% azida sódica, p/v, en PBS, que inactiva la LPO. Tras 30 minutos se añaden 50 µl de una solución de yoduro potásico, 10 mg/ml, en PBSA a la mezcla de reacción, cromatografiándola después en una columna de Sephacryl S-300 o Sephacryl S-200, 1 x 60 cm, equilibrada en PBSA-BSA, ya que hay que tener en cuenta que ambas enzimas también se marcan, y de ellos, la LPO de 93000 de peso molecular (Morrison y Huttquist, 1963), se encuentra en cantidad suficiente para constituir un contaminante apreciable, razón por la que la proteína- $\{^{125}\text{I}\}$ ha de separarse de ella, además de del yodo no incorporado.

Las fracciones que contienen la proteína de interés marcada, se mezclan y se dividen en alícuotas para conservarlas a -40°C .

II.6.3. Yodación de anticuerpos.

Para prevenir el marcaje de tirosinas que pudieran hallarse en los sitios combinatorios, los anticuerpos se marcan unidos a su antígeno, insolubilizado en agarosa.

100 μl de la suspensión de agarosa se lavan con 1 ml de glicocola-HCl 0.1M, pH 2.5, luego con 2 ml de yoduro potásico, 1 mg/ml, en PBS y finalmente con 5 ml de fosfato sódico 0.1M, pH 7.4. Entonces, se mezclan con cantidades saturantes de antisuero o de anticuerpo purificado y, tras lavar abundantemente con fosfato sódico 0.1M, pH 7.4, se añade a los tubos de vidrio con 4 μg de IodoGen, junto con 0.5 mCi de ^{125}INa . Después de 10 minutos a temperatura ambiente, agitando para que no sedimente la agarosa, la mayoría de la misma se transfiere a una pipeta Pasteur con un trozo de filtro de fibra de vidrio, que soporta una delgada capa de Bio-Gel P-4 sobre la que se vierte el inmunoabsorbente, constituyendo así una mini-columna.

Una vez lavada la agarosa del yodo no incorporado, pasando un exceso de tampón fosfato, los anticuerpos radiactivos se recuperan en los lavados de la columna con alícuotas de 0.4 ml de glicocola- HCl 0.1M, pH 2.5, que se recogen en tu-

bos con 0.1 ml de Tris-HCl 2.5M, pH 8.5 y BSA, 10 mg/ml, conservándose de igual modo que las proteínas marcadas por otros métodos.

II.6.4. Calidad de las proteínas marcadas con ^{125}I .

Puesto que la intención del marcaje es la de introducir una pequeña cantidad de yodo radiactivo en la proteína, solamente a modo de trazador, es necesario que las características estructurales no se alteren durante el proceso de yodación.

En primer lugar, conviene asegurar que toda la radiactividad está asociada a la proteína, lo que se estima a partir de la fracción de la misma que es precipitada por ácido. Para ello se mezclan volúmenes iguales de la solución con la proteína- $\{^{125}\text{I}\}$, en PBSA-BSA, y TCA al 20%, p/v, en tubos de microfuga de polietileno. Tras 1 hora a 4°C , se centrifugan 5 minutos en una microfuga B, de Beckman, y el sedimento se cuenta después de lavarlo dos veces con 10% TCA, p/v. Normalmente, el 95% de las cuentas puestas es precipitado de este modo.

Asimismo, una fracción similar de radiactividad es precipitada específicamente por su antisuero correspondiente, figura II.15i, lo que da cierta idea de la preservación de la actividad antigénica y estado estructural de la proteína marcada.

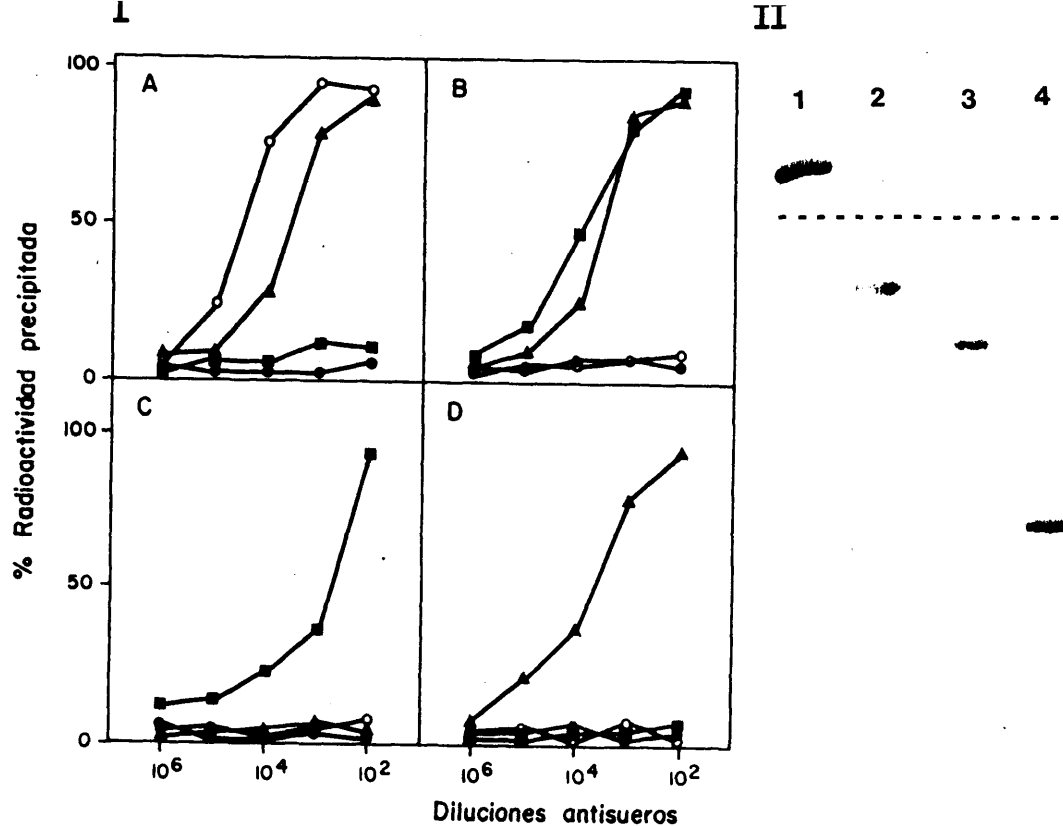


Figura II.15. Análisis de inmunoglobulinas y sus fragmentos después de marcados con ^{125}I .

I, los paneles A, B, C, y D, muestran las fracciones de 80-100000 cpm de $\text{IgM}\{^{125}\text{I}\}$ ($1.2\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), $\text{IgG}\{^{125}\text{I}\}$ ($3.1\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), $\text{Fc}_\gamma\{^{125}\text{I}\}$ ($5.7\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) y $\text{F(ab')}_2\gamma\{^{125}\text{I}\}$ ($4.8\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), respectivamente, precipitadas en un ensayo de doble anticuerpo (II.8.1.) con las diluciones indicadas de sueros de conejo anti- $(\text{Fc})_{5\mu}$ (o), anti- Fab_γ (\blacktriangle), anti- Fc_γ (\blacksquare) y suero de conejo no inmune (\bullet).

II, autorradiograma del análisis por SDS-PAGE, en un gel de 5.2%C y 7.5%T, de $\text{IgM}\{^{125}\text{I}\}$ (1), $\text{IgG}\{^{125}\text{I}\}$ (2), $\text{F(ab')}_2\gamma\{^{125}\text{I}\}$ (3) y $\text{Fc}_\gamma\{^{125}\text{I}\}$ (4), preparado como se indica en II.5.2.2.. El trazo discontinuo señala la separación entre gel superior (4%T) e inferior.

Adicionalmente, las proteínas- $\{^{125}\text{I}\}$ se analizan por SDS-PAGE y autorradiografía, figura II.15ii, y por filtración en pequeñas columnas de Sepharose 6B y Sephacryl S-300 y S-200, para evaluar la integridad de sus polipéptidos y su estado de agregación, ayudando a establecer cualquier modificación que pueda haberse producido durante el marcaje.

Para descartar la utilización de preparaciones que pudieran estar deterioradas con el tiempo de almacenamiento (inestabilidad del enlace proteína-I, actividad de radicales libres producidos en la desintegración del ^{125}I , etc.) a los dos meses del marcaje se desechan.

II.6.5. Cálculo de la actividad específica.

El método empleado se basa en que la separación cromatográfica de los productos de la reacción de marcaje, el yodo no incorporado a la proteína se recupera íntegramente en el pico de sales de la columna (Grenwood y col., 1963), de modo que la fracción de proteína que se obtiene en el proceso viene determinada por la relación entre las cuentas del pico del volumen excluido y las correspondientes a las cargadas en la columna de filtración, una vez restadas las del pico de sales.

Con este valor, y efectuando las correcciones de volúmenes apropiadas, 90 μl de los 100 μl de mezcla de reac-

ción y 180 μ l de los 190 μ l finales, cromatografiados en Bio-Gel P-4, puede determinarse cuánta de la proteína inicial se tiene en el volumen excluido, y así estimar su radiactividad específica, en cpm/ μ g.

La estequiometría del producto obtenido puede calcularse si se conoce su actividad absoluta, pues a partir de ella, del valor de la actividad específica del ^{125}I Na y de la masa atómica del yodo, se determina el número de átomos de ^{125}I incorporados por molécula de proteína marcada.

Al efectuar el conteaje en un espectrómetro multicanal de radiación gamma (Modumatic VI-Autogamma, modelo 5360, de Packard) de modo que en uno de los canales se tengan las cuentas del fotopico del espectro de emisión del ^{125}I , P, y en otro el total de cuentas, T, la actividad absoluta de la muestra considerada resulta de la relación $(2T-P)^2/4(T-P)$ (Eldridge, 1964). Normalmente se ha trabajado con eficiencias de conteaje en torno al 75%.

Así, el grado de sustitución conseguido en el marcaje, como átomos de ^{125}I por molécula de proteína, se calcula a partir de la actividad específica de la preparación, en dpm/molécula (hay que conocer el peso molecular de la proteína que se marca) y de la actividad específica del ^{125}I , 7.6×10^{-6} dpm/átomo, suponiendo una abundancia isotópica del 95% en el ^{125}I Na utilizado. Habitualmente se consiguen incorporaciones de 0.1-1 átomos de ^{125}I por molécula de

proteína, indicándose en la figura II.15, las actividades específicas, en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ correspondientes a las proteínas que allí se muestran.

II.7. MAPAS BIDIMENSIONALES DE PEPTIDOS YODADOS

Este procedimiento (Elder y col., 1977) permite obtener los mapas peptídicos de proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, compensándose la escasez de material disponible para el análisis con el aumento de sensibilidad conseguido al marcar radiactivamente los polipéptidos con ^{125}I .

II.7.1. Preparación de los péptidos radiactivos.

El fragmento de poliacrilamida con la proteína que quiere analizarse se corta con un bisturí del gel, fijado y teñido, poniéndose en un tubo de vidrio siliconizado por impregnación con Sigmacote, donde se lava con una solución de 25% isopropanol, v/v, con varios cambios, para quitar el colorante unido a la proteína. Los últimos lavados se hacen con 10% metanol, v/v.

Ahora la poliacrilamida se seca, por liofilización, y se rehidrata durante 30 minutos en 60 μl de fosfato sódico 0.1M, pH 7.4, conteniendo 0.3 mCi de ^{125}INa . El marcaje comienza al añadir 10 μl de cloramina T, 1 mg/ml, en agua, y finaliza 30 minutos después, al añadir 100 μl de metabisul-

fito sódico, 3 mg/ml, en tampón fosfato. Tras 15 minutos, las piezas de poliacrilamida se transfieren a nuevos tubos de vidrio siliconizado, donde se lavan con numerosísimas alícuotas de 5 ml de 10% metanol, v/v, hasta que la radiactividad lavada se estabiliza en un valor bajo.

Cuando se considera que todo el yodo no unido a proteína ha sido lavado, la poliacrilamida se seca por liofilización y se rehidrata en 0.3 ml de bicarbonato amónico 0.05M, pH 8.1, en un baño a 37°C, donde la proteína incluida en la poliacrilamida es digerida con 25 µg de tripsina tratada con DPCC, durante 16-18 horas. Las soluciones de bicarbonato, que contienen los péptidos producidos en la digestión, se pasan a tubos nuevos y se liofilizan.

II.7.2. Electroforesis y cromatografía en capa fina.

Los péptidos se separan inicialmente por electroforesis en cromatofolios de celulosa de 20 x 20 cm, donde se aplican, con ayuda de un capilar de vidrio, 5 µl (10^6 cpm) en una de sus esquinas, a 3 cm de los bordes, disueltos en tampón de electroforesis: 10 ml de piridina, 100 ml de ácido acético y agua hasta 1 litro.

Los cromatofolios se colocan sobre una placa de refrigeración por la que circula agua a 14°C, y tras poner sus bordes en contacto con el tampón de los electrodos, a través de tiras de papel Whatman 3MM, se inicia la electrofo-

resis, en un campo constante de 600V. A la misma altura de la placa en que se aplican los péptidos, pero en otro punto, se ponen 2 μ l de una mezcla de 0.5% xylene cyanol, p/v, y 0.1% N-N'-diDNP-lisina, p/v, como marcadores de electroforesis.

Cuando ambos colorantes se han separado 2 cm, aproximadamente 110 minutos después de haber comenzado la electroforesis, el cromatofolio se seca con la corriente de aire de un secador de pelo y se efectua la separación cromatográfica, en dirección perpendicular a la de electroforesis, en un sistema ascendente desarrollado con butanol: piridina: ácido acético: agua (32.5: 25: 5: 30), hasta que el frente llega a 1 cm del borde superior del cromatofolio.

La distribución de péptidos se revela por autorradiografía (II.5.2.2.) del cromatofolio seco, otra vez, tras la cromatografía.

II.8. RADIOINMUNOENSAYOS

En este apartado se describen los métodos empleados en el estudio de la reactividad de antígenos y anticuerpos, con cualquiera de ellos marcado radiactivamente. Estos ensayos evalúan su asociación en experimentos de fijación directa, así como el efecto sobre dicha unión de otros antígenos, no radiactivos, observado en experimentos de inhibición y de competición.

Como las concentraciones de reactivos empleadas son muy bajas, los tampones en que se efectuan estos ensayos contienen BSA, para minimizar su adsorción inespecífica. Las distintas determinaciones se efectuan, asimismo, por duplicado.

II.8.1. De doble anticuerpo.

Los inmunocomplejos formados en el ensayo están demasiado diluidos para precipitar, pero pueden reunirse acomplejándolos con un segundo anticuerpo, que reconociendo al primero, en presencia de inmunoglobulina no inmune del mismo animal del que procede el primer antisuero, constituye un segundo sistema antígeno-anticuerpo, con cantidades de reactivos que aseguran su precipitación (Hunter, 1978).

En tubos de microfuga de polietileno, de 0.4 ml de capacidad, se mezclan 75 μ l de la solución de antígeno radiactivo, unas 40000 cpm, y 25 μ l de una dilución de antisuero que une el 50-60% de la máxima cantidad de antígeno capaz de ser unida, en presencia de tampón o del antígeno competidor. Tras mezclar bien, se deja incubar 16 horas a 4°C. Ahora se añaden 150 μ l de suero de oveja anti-IgG de conejo, absorbido con suero humano, e IgG de conejo no inmune, en 50 μ l, suficiente para tener, junto con la del primer anticuerpo, no más de 5-6 μ g por tubo, cantidad que es precipitada totalmente, al hallarse el segundo sistema antígeno-anticuerpo en leve exceso de anticuerpo.

Tras 1 hora a temperatura ambiente y otra hora a 4°C, los tubos se centrifugan en una microfuga, a 4°C, durante 5 minutos. El sobrenadante se extrae por aspiración, con una jeringuilla provista de una aguja que no llega al fondo del tubo, y el sedimento se lava dos veces con 0.35 ml de PBSA-BSA antes de contarse en el espectrómetro de radiactividad gamma.

En este ensayo, se introduce un control de precipitación inespecífica, consistente en la sustitución del primer anticuerpo por otro, también de conejo, pero de especificidad no relacionada con los antígenos considerados. Las cuentas de este tubo, C, se restan de todos los otros, como inespecificidad interna del ensayo, que nunca supera el 2-3% de la radiactividad puesta.

Del mismo modo, las cuentas específicamente precipitadas en ausencia de inhibidor, T, reflejan el máximo de radiactividad unida, por lo que el cálculo del grado de inhibición conseguida por un antígeno dado se expresa como:

$$\{(cpm \text{ en presencia de inhibidor} - C)/T\} \times 100.$$

II.8.2. De fase sólida.

Con esta denominación se designan aquellos ensayos en los que el antígeno o el anticuerpo se encuentran insolubilizados sobre algún soporte, como plástico, agarosa, etc..

La insolubilización se ha efectuado en placas de PVC que contienen pocillos de fondo redondo o plano, de 0.2-0.4 ml de capacidad, en cada uno de los cuales se hace una determinación. El antígeno o el anticuerpo, disueltos en 50 μ l de bicarbonato sódico 0.1M, pH 8.5, a la concentración apropiada en cada caso, se ponen en estos pocillos, dejándolos a temperatura ambiente durante 2 horas.

Entonces se vacían y aquellos sitios del plástico que fueran capaces de unir aún proteína, se bloquean añadiendo a los pocillos 0.1 ml de PBSA-BSA, incubando la placa, a temperatura ambiente, durante 1 hora.

En los ensayos de fijación directa, el antígeno o el anticuerpo radiactivos, 20-50000 cpm en 50 μ l de PBSA-BSA, se incuban en las placas cubiertas como se ha indicado antes, durante 1-2 horas, dependiendo del ensayo, a temperatura ambiente. Los pocillos se vacían, se lavan 5 veces con 0.2 ml de PBSA-BSA y se cuentan, recortándolos, si la placa es de PVC flexible, o contando 90 de los 100 μ l de hidróxido potásico 2M utilizados para despegar la radiactividad del plástico, si se trata de PVC rígido.

La fijación inespecífica se estima a partir de la radiactividad de pocillos que en la etapa de insolubilización fueron cubiertos sólo con tampón bicarbonato.

Para los ensayos de inhibición, el componente radiactivo, 20 μ l, se mezcla con las soluciones de inhibidor,

40 μ l, de concentración variable por su dilución seriada en tampón PBSA-BSA, en pocillos de placas de PVC rígido. Tras su incubación a temperatura ambiente durante 16 horas, alícuotas de 50 μ l, 20-60000 cpm, se añaden a placas previamente cubiertas con una cantidad de reactivo suficiente para unir el 80% del máximo de cuentas que se unirían, donde se dejan durante 2 horas, a temperatura ambiente, siguiendo el proceso descrito para los ensayos de fijación directa.

En los ensayos de competición, el trazador y el inhibidor, disueltos en 50 μ l de PBSA-BSA, se añaden, una vez mezclados como se ha dicho antes, a las placas que se han cubierto con una cantidad limitante de reactivo, donde se efectúa la incubación, durante 1 hora, a temperatura ambiente, siguiendo después los pasos ya indicados.

El cálculo de la inhibición de la fijación observada en cada caso, se efectúa como en II.8.1.

II.9. INTERACCION CON PROTEINA A

Aquí se incluyen los experimentos que no son de cromatografía de afinidad con PA-Sepharose, y en los que se han utilizado las inmunoglobulinas, o la PA, marcadas radiactivamente. Comprenden ensayos de fijación a PA insolubilizada, como células de *S. aureus* o unida a placas de plástico, así como reacciones de precipitación directa y de co-precipitación, con la PA en forma soluble.

II.9.1. Fijación a células de *S. aureus*.

Se han empleado organismos de la cepa Cowan, previamente muertos por calor y tratados con formaldehído, conservados liofilizados o a 4°C en suspensión en PBSA-BSA al 10%, v/v. Inmediatamente antes de su utilización, las bacterias se lavan dos veces con el mismo tampón, resuspendiéndolas a una concentración determinada por su A_{525} , asumiendo que la correspondiente de una suspensión de 5×10^8 células/ml es de 0.3 (Movitz, 1976).

Los ensayos se han realizado en tubos de microfuga de polietileno, de 0.4 ml de capacidad, a temperatura ambiente y con agitación rotatoria, para mantener las células en suspensión, en un volumen final de 0.15 ml, durante 1-2 horas. Las inmunoglobulinas o sus fragmentos que se han fijado a las bacterias se separan por centrifugación en una microfuga, a 4°C, durante 4 minutos, aspirando el sobrenadante como se ha indicado en II.8.1.. Los tubos se cuentan en un espectrómetro de radiactividad gamma, después de lavarlos dos veces con 0.35 ml de PBSA-BSA.

La fijación inespecífica, estimada a partir de la radiactividad que, en idénticas condiciones experimentales, se une a células que han sido tratadas con pepsina, 10 mg/ml de suspensión de estafilococos al 10%, v/v, en acetato sódico 0.1M, pH 4.0, durante 16 horas a 37°C, para eliminar la PA de su superficie, oscila entre el 3-6% del total de ra-

diactividad que se ha añadido, y se resta sistemáticamente de las cuentas unidas a las bacterias con PA, para determinar la fijación específica.

Los distintos ensayos, por duplicado y en PBSA-BSA, bien de fijación directa a las células, de su inhibición por anticuerpos o de competición por inmunoglobulinas y sus fragmentos, siguen lo expuesto para los radioinmunoensayos análogos, especificándose en los pies de las figuras las características concretas de cada ensayo.

En el estudio de la dependencia de la fijación de IgM a los estafilococos respecto del pH del medio, el tampón utilizado está constituido por una mezcla de ácido dietilbarbitúrico, fosfato dipotásico y ácido bórico, 0.03M de cada uno, llevando con hidróxido sódico o HCl el pH al valor deseado (Tengblad, 1980).

El efecto de la proteólisis parcial de los estafilococos sobre su capacidad de fijación de inmunoglobulinas y sus fragmentos, se estudió con células incubadas en tubos de microfuga de polipropileno, al 1%, v/v en citrato sódico 0.1M, pH 4.0, o en PBSA, durante 1 hora a 37°C, con cantidades variables de pepsina y tripsina, respectivamente, preparadas por diluciones sucesivas de sendas soluciones de una concentración inicial de proteasa de 0.5 mg/ml.

La digestión en los tubos con pepsina se detuvo su-

biendo el pH del medio, y la de los tubos con tripsina al añadir inhibidor de tripsina de soja, en 10% exceso, en peso, de enzima. Tras 1 hora a temperatura ambiente, las bacterias se lavaron 5 veces con PBSA-BSA.

II.9.2. Fijación a proteína A en placas de plástico.

La insolubilización de la PA, así como el resto de las operaciones en los ensayos de inhibición de la fijación de inmunoglobulinas por anticuerpos, o de competición por inmunoglobulinas y fragmentos no marcados, se efectúan de modo similar a lo descrito en II.8.2.

II.9.3. Análisis de los datos de fijación.

Los resultados de los experimentos de inhibición y de competición se expresan del modo que se ha descrito en II.8.1..

El cálculo de las constantes de asociación aparentes, K_a , en experimentos de fijación directa a células, así como la concentración de receptores de inmunoglobulina, n , se han efectuado por procedimientos analíticos, a partir de la representación de Scatchard (Scatchard, 1949), utilizando un rango de concentraciones de ligando que sature la capacidad de fijación del mismo de las células empleadas en el experimento, 1.5×10^8 .

La concentración molar de inmunoglobulina unida, B, se estima a partir de su actividad específica absoluta, en tanto que la de la fracción no unida, F, se obtiene de la diferencia entre la de inmunoglobulina total presente y la de la unida.

Los datos experimentales representados de este modo parecen ajustarse a la relación $B/F = K_a(n-B)$, correspondiente a un sistema receptor de n sitios idénticos e independientes. La expresión de la recta de regresión de esos datos se calcula por el método de mínimos cuadrados, utilizando el coeficiente de correlación para evaluar la hipótesis de ausencia de correlación entre B/F y B (Cramer, 1972).

En algunos casos la K_a se ha calculado del inverso de la concentración de inmunoglobulina no marcada que produce una inhibición del 50% de la fijación de la inmunoglobulina radiactiva. Esto se ha hecho en experimentos de fijación a PA insolubilizada en plástico, de modo que las concentraciones de PA e inmunoglobulina marcada sean suficientemente bajas (Cuatrecasas y Hollenberg, 1975).

II.9.4. Reacciones de precipitación y coprecipitación.

Difieren, esencialmente, en que las de coprecipitación llevan, además de la PA y la inmunoglobulina, el fragmento $Fc\gamma$.

Se hacen en tubos de polietileno de microfuga, de 0.4 ml de capacidad, con todos los reactivos disueltos en PBSA-BSA o en Tris-HCl 0.05M, pH 7.6, cloruro sódico 0.12M, azida sódica 0.1%, p/v, PEG 6000 3%, p/v y Tween 20 0.1%, v/v. La extensión de la reacción se mide como radiactividad sedimentable por centrifugación en microfuga a 4°C, durante 5 minutos, tras 20-24 horas de incubación a temperatura ambiente, y que es lavada dos veces con 0.35 ml de tampón antes de contarse en el espectrómetro de radiactividad gamma.

En los experimentos de coprecipitación, la IgM y el Fc γ se mezclan previamente antes de añadirlos a tubos con PA. La composición exacta de las mezclas de reacción, que se indica en los pies de las figuras, depende del tipo de ensayo. En unos la inmunoglobulina radiactiva, con o sin Fc γ , se incubaba con una cantidad variable de PA, en tanto que en otros, por ejemplo, manteniendo constantes las concentraciones de los otros reactivos se varía la de Fc γ , etc. Para el estudio de la composición del complejo precipitable, los ensayos se han hecho por triplicado, de modo que el componente radiactivo en la mezcla es, en cada uno de ellos, distinto.

Otro grupo de experimentos es el constituido por los de inhibición de la reacción de precipitación y coprecipitación. En ellos, para una relación inmunoglobulina:PA predeterminada, se incluyen cantidades variables de inhibidor, fragmentos de inmunoglobulina o anticuerpos, que se mezclan

previamente con la inmunoglobulina radiactiva, antes de añadirlos, inmediatamente, a los tubos con PA.

Los tubos con los precipitados inespecíficos difieren de los otros en que carecen de Fcy, en los experimentos de coprecipitación, o de PA, en los de precipitación directa, y las cuentas sedimentadas en estos casos se sustraen para el cálculo de la precipitación específica.

Los resultados de los experimentos de inhibición se expresan como se ha indicado en II.8.1..

II.10. MATERIALES

Medios cromatográficos: Sephacryl S-200, Sephacryl S-300, Sepharose 6B, Sephadex G-150 superfino, DEAE-Sephacel, Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno, PA-Sepharose CL4B, de Pharmacia Fine Chemicals; CM 52 y DE 52, de Whatman; cromatofolios de celulosa (5577), de Merck; Bio-Gel P-4, de Bio-Rad Laboratories.

Colorantes: CBB G-250 y xylene cyanol FF, de Serva Feinbiochemica; CBB R-250 y N-N'-di-DNP-Lys, de Sigma Chemical Co.; azul de bromofenol, de Merck.

Materiales de electroforesis: TEMED, acrilamida y agarosa de baja electroósmosis, de Sigma Chemical Co.; acrilamida, N-N'-metilenbisacrilamida, persulfato amónico, Tris, Glicina, Glicerol, de Merck; Anfolitos, pH 3.5-10, de LKB; Isogel y Gel Bond film, de FMC corporation.

Materiales de marcaje radiactivo de proteínas: Iodo-Gen, de Pierce; Cloramina T, metabisulfito sódico, glucosa y peróxido de hidrógeno, de Merck; L-tiroxina, de Sigma; ^{125}I sódico, de "The Radiochemical Center" de Amersham.

Sueros, antisueros, inmunoglobulinas: suero de cerdo, de GIRESA; otros sueros, del animalario del departamento; IgG humana, de Kabi; proteínas de mieloma, de pacientes del hospital; IgA humana de calostro, de Sigma Chemical Co.; antisueros anti-IgM, anti-IgA y anti-IgG, de Behring Institute y de Operon; antisue-

ros anti-subclases de IgG humana, de Nordic Immunological Laboratories.

Disolventes y ácidos orgánicos: Butanol, Piridina, Isopropanol, Dioxano, Cloroformo, Metanol, Etanol, Acido Acético, Acido fórmico, Acido Tricloroacético, Acido Perclórico, Acido Sulfosalicílico, de Merck; Triton X-100, de Sigma Chemical Co.; Tween 20, de Serva Feinbiochemica.

Proteínas y Enzimas: Papaína (tipo IV), Tripsina (tipo XI), Pepsina, BSA, LPO, GO (tipo VII), α -quimotripsinógeno A (tipo II), Conalbúmina, Citocromo c, Mioglobina, Inhibidor de tripsina de soja, de Sigma Chemical Co.; Lisozima, Anhidrasa Carbónica y Cadena β de insulina, de Serva Feinbiochemica; Catalasa, de Calbiochem; Proteína A de *S. aureus*, de Pharmacia Fine Chemicals.

Materiales radioinmunoensayos e interacción con PA: tubos de microfuga de polietileno de Beckman; células de *S. aureus*, de Sigma Chemical Co.; Placas de pocillos de PVC, de Nunc y de Linbro.

Acidos y sales inorgánicos: de Merck y Carlo Erba.

Otros materiales: 2-mercaptoetanol, Etanolamina, PMSF, EDTA, DTT, de Sigma Chemical Co.; PEG 6000 y 40000, membranas de diálisis, Glutaraldehído, de Serva Feinbiochemica; L-cisteína y urea, de Merck; Adyuvantes Completo e Incompleto de Freund, de Difco Laboratories; Clorhidrato de Guanidina, de Carlo Erba;

Agarosa de electroósmosis media, de FMC Corporation; Papel de filtro 3MM y tipo 1, papel de fibra de vidrio GF/A y GF/C, de Whatman; Yodoacetamida, de Sigma Chemical Co.; Películas de autorradiografía X-OMAT S y X-OMAT MA, de Kodak-Pathe.

RESULTADOS Y DISCUSION

- III.1. Interacción de IgM policlonal humana con proteína A.
- III.2. Sitios de proteína A para las reactividades clásica y alternativa.
- III.3. Receptores de proteína A de una IgM monoclonal humana.
- III.4. Receptores de proteína A en estructuras de dominios variables de cadenas pesadas.
- III.5. Discusión general.

III.1. INTERACCION DE IgM POLICLONAL HUMANA CON PROTEINA A

III.1.1. IgM reactiva con proteína A.

III.1.1.1. Aislamiento de IgM por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose.

La interacción de la IgM humana con la PA de *S. aureus* se ha estudiado utilizando una preparación de inmunoglobulinas de esta clase aisladas de suero humano normal por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose (II.1.2.4.).

La electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, de la IgM así obtenida, figura III-1A, produce una banda de escasa movilidad, de acuerdo con su alto peso molecular, y cuando es reducida con DTT, dos bandas de movilidades correspondientes a las de las cadenas ligeras y cadenas pesadas μ .

La figura III.1B., muestra asimismo el análisis por inmunolectroforesis de la IgM eluida de PA-Sepharose, y aunque con los sueros anti-suero humano utilizados sólo se aprecia la banda de precipitación de la IgM, en esta preparación puede apreciarse la presencia de IgG e IgA, en cantidades que, estimadas por inmunodifusión radial, representan el 2 y 4%, respectivamente, del total de material retenido en PA-Sepharose, como se indica en la tabla III.1., del que más del 90% es IgM, de acuerdo con la fracción del mismo que es precipitada por antisueros específicos de cadena μ

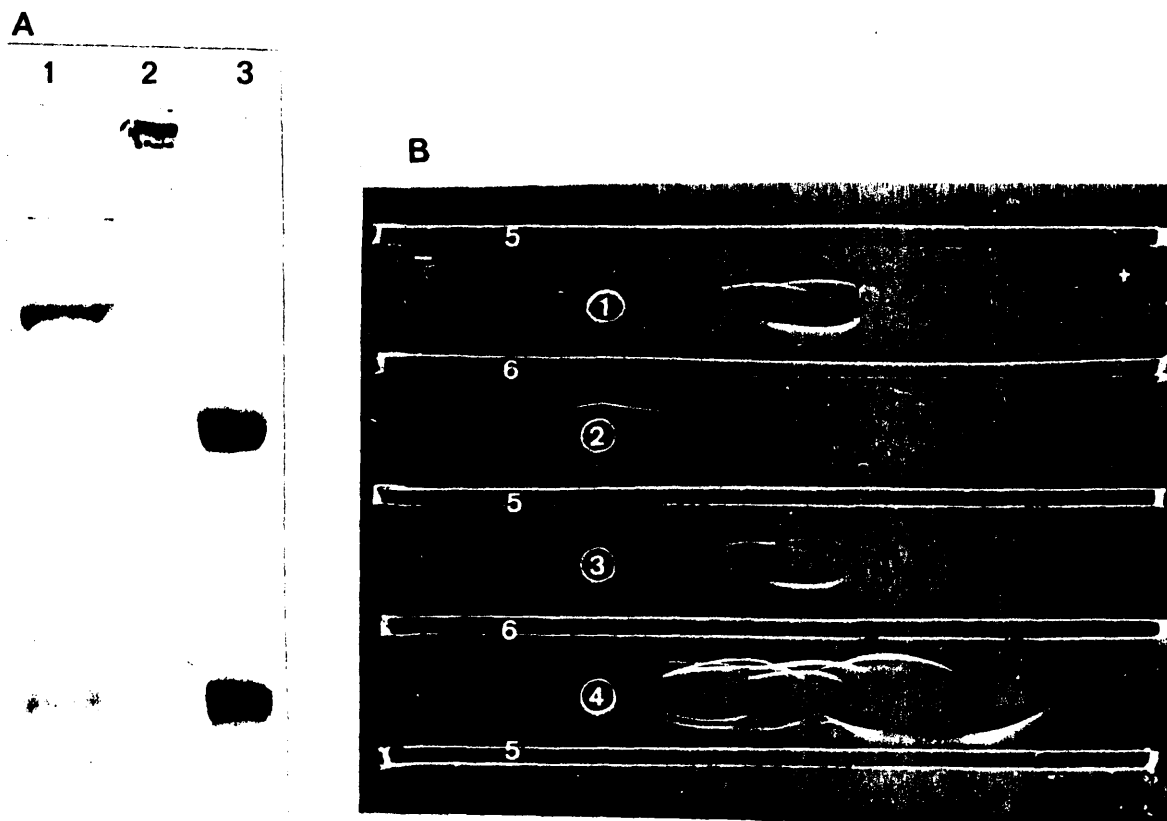


Figura III.1. Caracterización de la IgM policlonal aislada por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose.

A, análisis por SDS-PAGE en un gel de 3.5%C, con 4%T en su región superior y 10%T en la inferior, de IgM reducida (1) y no reducida (2), que queda en el gel superior. Como referencia IgG reducida en (3).

B, análisis por inmunoelectroforesis de la IgM eluida de PA-Sepharose (2) con sueros anti-suero humano total (5) y anti-fracción de suero humano de baja concentración en IgG y albúmina (6). Los otros pocillos contienen: suero humano (4), macroglobulinas cromatografiadas en PA-Sepharose (3) y su fracción no retenida en esa columna (1).

Tabla III.1, DISTRIBUCION DE IgM, IgA e IgG EN LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL PROCESO DE PURIFICACION DE IgM, DETERMINADAS POR INMUNODIFUSION RADIAL

	Proteína en mg		
	IgM	IgA	IgG
Muestra original ^a	50	90	585
Macroglobulinas (de Sephacryl S-300)	46.2	2.38	- ^b
No unido a PA-Sepharose ^c	22.6	1.42	-
Unido a PA-Sepharose ^c	17.53(93.8) ^d	0.79(4.2)	0.37(1.98)

a, calculadas tomando como concentraciones de IgM, IgA e IgG en suero, 1, 1.8 y 11.7 mg/ml, respectivamente.

b, no detectada.

c, corresponde al pico de una primera cromatografía.

d, entre paréntesis el porcentaje del total de inmunoglobulina presente en ese pico.

(figura II.15I.).

El procedimiento de purificación empleado, se desarrolló a partir de la observación, figura III.2., de la presencia regular de IgM en la fracción de suero humano con afinidad por la columna de PA-Sepharose, formando, junto a la IgA (Van Kamp, 1979), el 8-9% de esa fracción, constituida principalmente por IgG (tabla III.3.).

III.1.1.2. Utilización de tampones disociantes en la elución de IgM de PA-Sepharose.

La fuerte interacción de la IgM con la PA-Sepharose determina el empleo de condiciones disociantes para su completa elución de la columna, obteniéndose con soluciones de isotiocianato sódico 3M o clorhidrato de guanidina 4M, recuperaciones algo mayores que la obtenida con tampones ácidos como el descrito (tabla III.2.). No obstante, todos estos tratamientos, y el cambio de pH quizá más que los otros, deben afectar notablemente a su estructura tridimensional, ya que, como se indica en la misma tabla, cuando el material así eluido es recromatografiado en PA-Sepharose, se observa que parte de la IgM ha perdido su capacidad de unión a la columna.

Afortunadamente, esta probable desnaturalización puede reducirse si el tratamiento disociante se abrevia al máximo, como en la neutralización inmediata del eluido, pues entonces la disminución de la capacidad de interacción con la PA-Sepha-

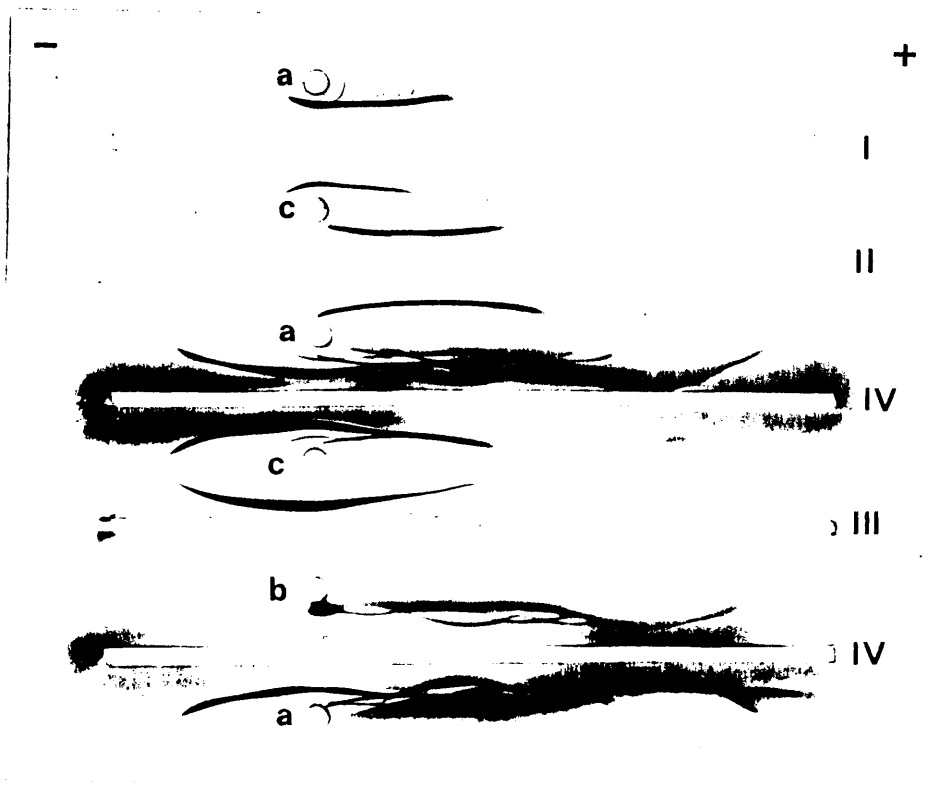


Figura III.2. Análisis por inmunoelectroforesis de la fracción de suero humano retenida en PA-Sepharose. El pocillo (a) tiene suero humano, y su fracción no unida y unida a PA-Sepharose en los (b) y (c), respectivamente. Los antisueros son: anti-IgM (I), anti-IgA (II), anti-IgG (III) y anti-suero humano (IV).

Tabla III.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO DISOCIANTE EN EL AISLAMIENTO DE IgM POR CROMATOGRAFIA EN PA-SEPHAROSE

	Tampón elución primera cromatografía		
	PBS-GuHCl 4M	PBS-NaSCN 3M	Gly-HCl 0.1M
IgM cargada	8.9 mg	7.7 mg	7.1 mg
No unida a PA-Sepharose	3.1	3.4	3.1
Eluida de PA-Sepharose con tampón ácido.	4.2	4.2	2.9

Volúmenes iguales de la fracción de macroglobulinas recogidas de la columna de Sephacryl S-300, se cargan en la columna de afinidad eluyendo el material en ella retenido con los tampones señalados. Tras diálisis contra 200 volúmenes de PBSA, se recromatografía en PA-Sepharose, eluyendo ahora con Gly-HCl 0.1M, pH 2.5. La distribución de proteína se ha calculado a partir de su A_{280} y el coeficiente de absorción de la IgM.

rose resulta minimizada. Por esto, aunque el rendimiento es ligeramente inferior cuando la columna es eluida con tampón ácido, la posibilidad de revertir rápidamente el tratamiento, hace que éste fuera el procedimiento elegido. Además, la IgM así obtenida mantiene su estructura cuaternaria, como puede deducirse del patrón que resulta de su cromatografía en Sepharose 6B, figura III.3., que muestra su estado esencialmente desagregado.

III.1.1.3. Interacción con PA-Sepharose en función del pH.

La interacción de la IgM humana con la columna de PA-Sepharose es dependiente de pH, como sucede con la IgG de varios mamíferos (Ey y col., 1978; Duhamel y col., 1979; Delacroix y Vaerman, 1979). En la figura III.4., puede observarse que su elución con tampones de distinto pH produce fundamentalmente cuatro fracciones, en un patrón cromatográfico repetitivo en la distribución de proteína y en su forma, y que, además, muestra la necesidad de utilizar tampones muy ácidos para una completa recuperación de la IgM retenida en la columna.

Las movilidades electroforéticas de cada una de estas fracciones en agarosa, o su actividad antigénica con antisueros específicos de cadena μ , figura III.5., no desvela la posible heterogeneidad manifestada en ese patrón de elución, lo cual, unido a la inexistencia de variantes isotípi-

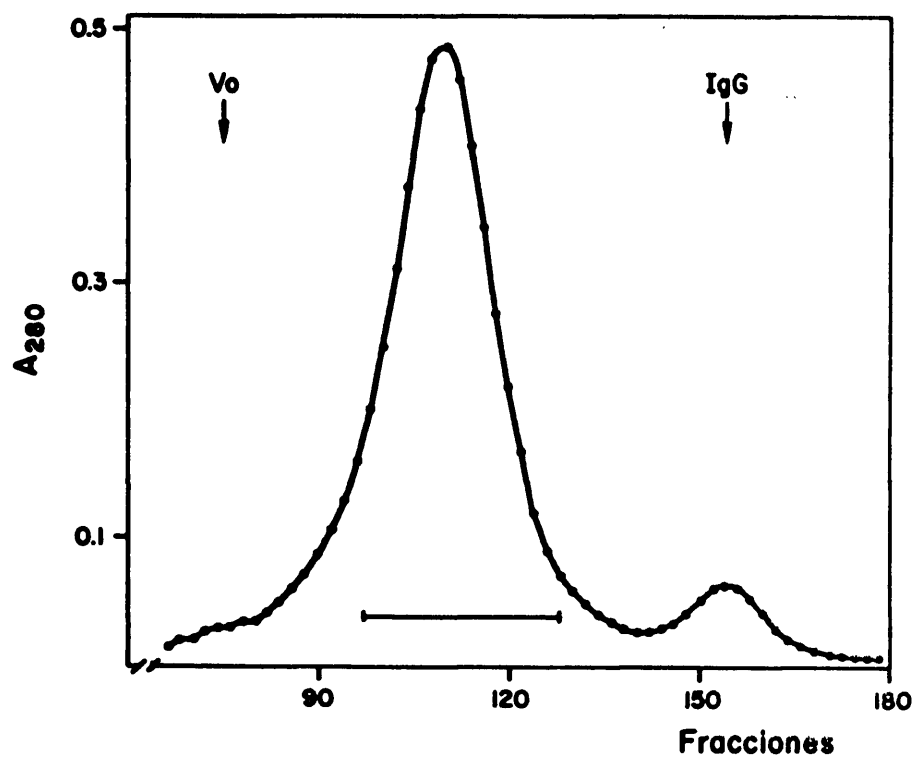


Figura III.3. Estructura de la IgM policlonal humana purificada por cromatografía de afinidad en PA-Sepharose. El cromatograma muestra la elución de la IgM filtrada en una columna de Sepharose 6B, 2.2 x 102 cm, a 15 ml/h con PBSA. Las fracciones son de 1.5 ml y se señalan las correspondientes al volumen excluido, Vo, y de elución de IgG.

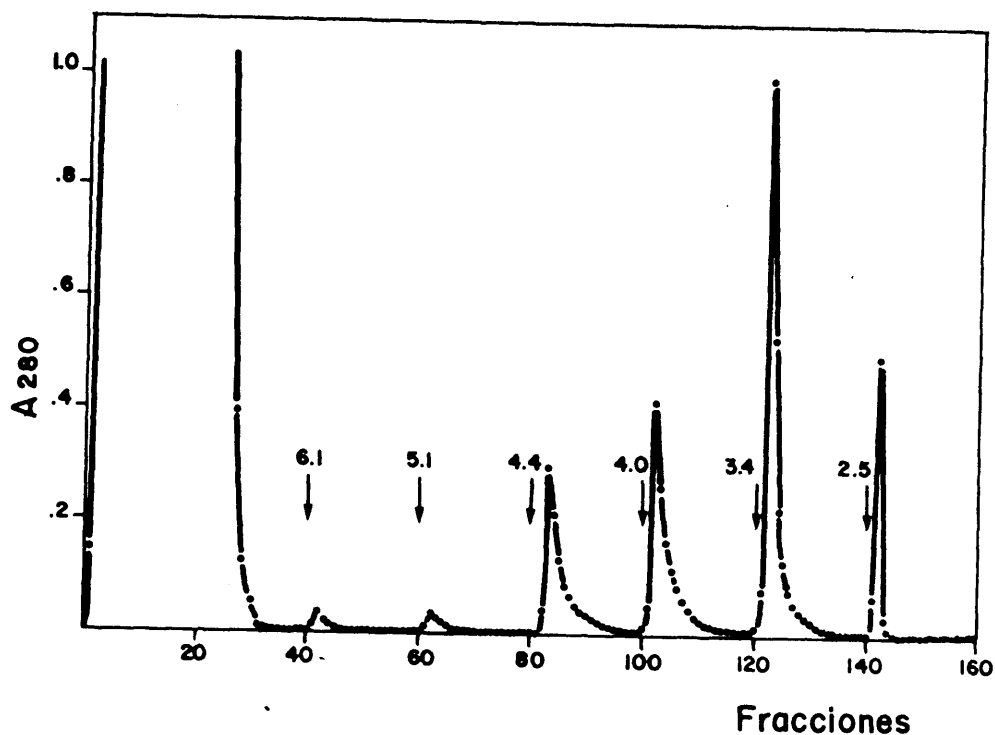


Figura III.4. Elución de IgM policlonal humana de PA-Sepharose en función del pH. Cromatografía de la fracción de macroglobulinas del suero en una columna de 1 x 7.5 cm de PA-Sepharose equilibrada en PBSA. La elución del material retenido se hace con los tampones de acidez creciente de la tabla II.2., a 50 ml/h, en fracciones de 3 ml. Los distintos pH se muestran junto a las flechas que señalan los cambios de tampón de elución.

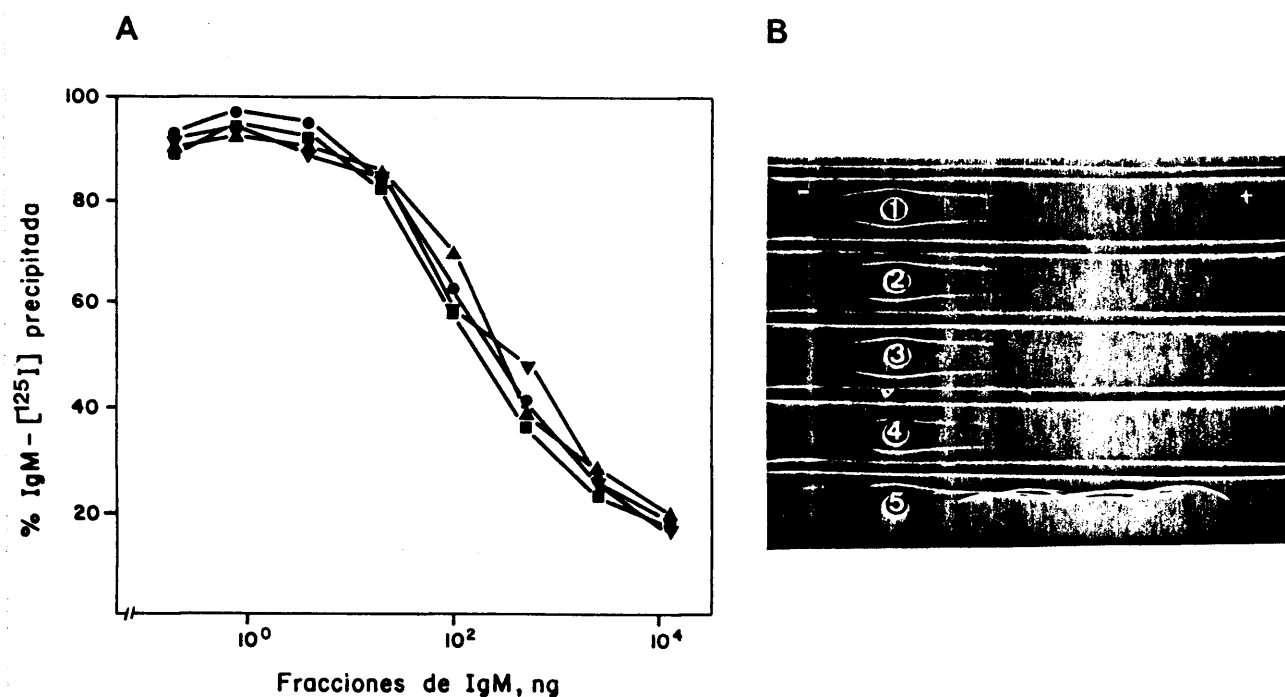


Figura III.5. Análisis de las fracciones de IgM obtenidas por elución de la columna de PA-Sephadex con tampones de acidez creciente.

A, inhibición competitiva de la unión de IgM(125 I) 35000 cpm, a un suero anti-IgM policlonal (H+L), por cantidades variables de IgM eluida de PA-Sephadex a pH 4.4 (■), a pH 4.0 (▲), a pH 3.4 (▼) y a pH 2.5 (●), en 100 μ l, de los que 25 son del antisuero 1:1000. Tras 16 horas se añaden 150 μ l de un suero de oveja anti-IgG de conejo y 50 μ l de una solución de IgG de conejo, 0.12 mg/ml, para precipitar la IgM(125 I) unida, en un ensayo de doble anticuerpo, según II.8.1.

B, inmunolectroforesis de la IgM eluida a pH 4.4 (1), pH 4.0 (2), pH 3.4 (3) y pH 2.5 (4), con un antisuero contra suero humano. En (5) suero humano.

cas o alotípicas conocidas en la IgM, hace difícil la interpretación de su comportamiento cromatográfico en la columna de PA-Sepharose.

La figura III.6. muestra el fraccionamiento que, de modo análogo, se produce cuando el material cromatografiado es suero humano: aquí se obtienen tantas fracciones como eluciones a distintos pH se efectúan y, como en el caso de la IgM, el patrón es representativo de otros realizados en condiciones similares de cantidad de muestra, tamaño de columna, etc. En cada una de ellas se detecta IgA e IgM, tabla III.3., sobre todo en las eluidas con los tampones más ácidos, y no se ha podido apreciar una resolución de las distintas subclases de IgG, tal como ha sido descrita (Duhamel y col., 1979; Biewenga y col., 1982), aunque en condiciones cromatográficas diferentes de las utilizadas aquí.

III.1.1.4. Rendimiento de la purificación de IgM.

Si la fracción de macroglobulinas de suero no retenida en PA-Sepharose vuelve a cargarse en la columna, puede eluirse con tampón ácido un segundo pico de inmunoglobulina, mucho más reducido, y un tercer aún menor en una nueva recromatografía, de modo que considerando como no reactiva con PA a la IgM presente en esta fracción de macroglobulinas tras sucesivas pasadas a través de la columna de PA-Sepharose, constituye el 50-60% de la IgM del suero, resultado que está de

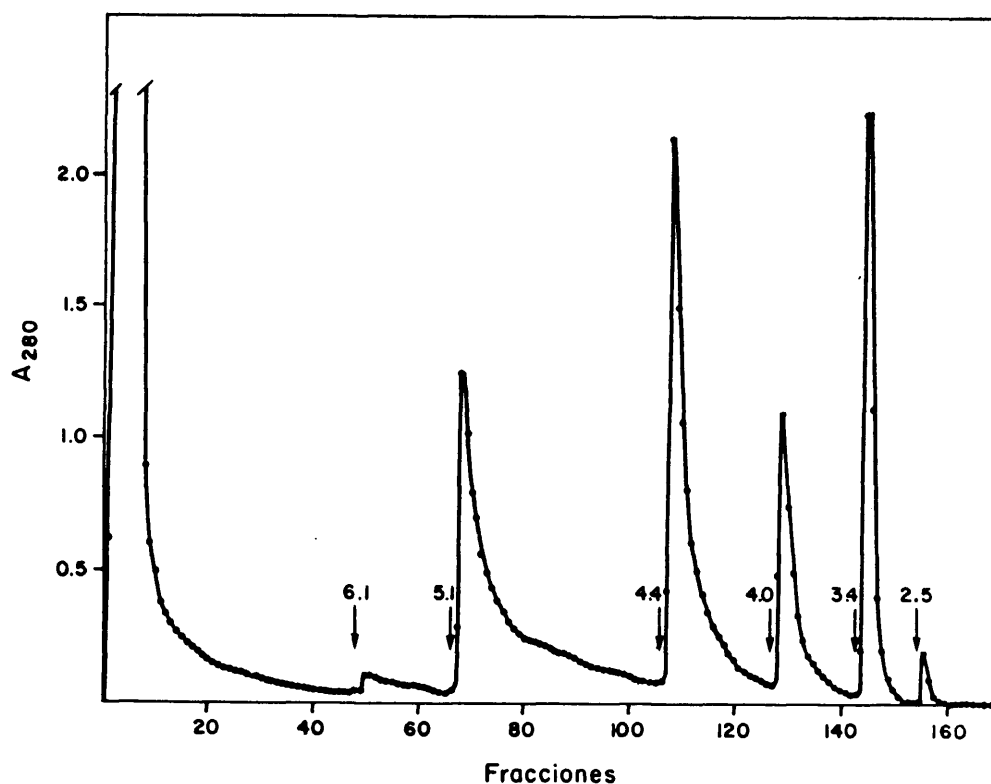


Figura III.6. Elución de la fracción de suero humano retenida en PA-Sepharose con tampones de distinto pH. Cromatografía de 10 ml de suero humano en una columna de 1 x 7.5 cm de PA-Sepharose equilibrada en PBSA. La elución del material unido se hace a 50 ml/h, con los tampones de acidez creciente de la tabla II.2.. El pH de cada uno de ellos se indica junto a las flechas que señalan el cambio de tampón de elución. Las fracciones son de 3ml.

Tabla III.3. ANALISIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN
LA ELUCION DEL MATERIAL DE SUERO HUMANO UNIDO
A PA-SEPHAROSE CON TAMPONES DE ACIDEZ CRECIENTE

pH elución	Proteína(mg)	IgA	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
6.1	2.51	+	++	+	++	-	+/-
5.1	25.7	+	+	+	+	-	+
4.4	16.5	+	+	+	+	-	+
4.0	7.85	+	+	+	+	-	+
3.4	8.4	++	++	+	+	-	+/-
2.5	<u>0.94</u>	<u>++</u>	<u>++</u>	+	+	-	+/-
	62 ^a	2.5 ^b	2.7 ^b				

a, la cantidad total de proteína se determina a partir de su A_{280} y el coeficiente de absorción de IgG, inmunoglobulina mayoritaria.

b, cantidades medidas por inmunodifusión radial, con suero específicos anti-IgA y anti-IgM.

La presencia de inmunoglobulinas se detecta por doble inmunodifusión, con sueros anti-IgA, anti-IgM y anti-subclases de IgG humana, indicando con - reacción negativa, y con + reacción positiva, señalando con más de una la intensidad aparente de las mismas.

acuerdo con la existencia de proteínas de mieloma reactivas y no reactivas con PA (Harboe y Folling, 1974).

El método de purificación utilizado tiene un rendimiento aceptable, en torno al 30-40% (tabla III.1.) y produce IgM reactiva con PA, motivo de interés adicional para este trabajo. Esto, junto a su simplicidad, le hace preferible a los procedimientos convencionales que suelen emplear la filtración de las euglobulinas del suero y la electroforesis preparativa de las macroglobulinas correspondientes (Chaplin y col., 1965) u otros menos generales, que producen fracciones enriquecidas en IgM por su acomplejamiento con ácido bórico (Mauch y col., 1980) o su retención en columnas con sustancias policatiónicas como la protamina (Wichman y Borg, 1977) y que, además de resultar más laboriosos, a veces no conducen a preparaciones de la pureza deseada.

El procedimiento descrito para la obtención de IgM policlonal humana puede, además, considerarse de validez general con método de purificación de IgM, y por sus características puede aplicarse a pequeñas cantidades de suero o a muestras de sueros individuales, teniendo en cuenta que el rendimiento va a depender, sobre todo, de la reactividad de las proteínas IgM consideradas.

III.1.2. Fijación de IgM policlonal a células de *S. aureus*.

III.1.2.1. Ensayos de fijación directa.

La reactividad de la IgM policlonal humana con PA se ha estudiado por medio de experimentos de fijación de la inmunoglobulina marcada radiactivamente a células de *S. aureus* con PA, mostrándose en la figura III.7. algunas de las características de este sistema de ensayo.

De la cinética de captación de IgM por células con PA, figura III.7A., puede apreciarse cómo a los 10 minutos el 80% de la IgM ya se halla unida a los estafilococos, por lo que para sucesivos experimentos se escogen 60 minutos como tiempo suficiente para asegurar las condiciones de equilibrio. La velocidad de asociación de la IgM es algo menor que la observada por procedimientos similares para IgG humana (Myhre y Kronvall, 1980b). La fijación a células sin PA, por otro lado, resulta muy pequeña y casi invariable desde el principio de la incubación, tal como característicamente sucede con las fijaciones inespecíficas (Cuatrecasas y Hollenberg, 1975).

En la figura III.7B. se muestra la fijación de IgM a los estafilococos en función del pH del medio, resultando una dependencia similar a la observada para IgG (Myhre y Kronvall, 1980b) y que se halla de acuerdo con su comportamiento cromatográfico en la columna de PA-Sepharose.

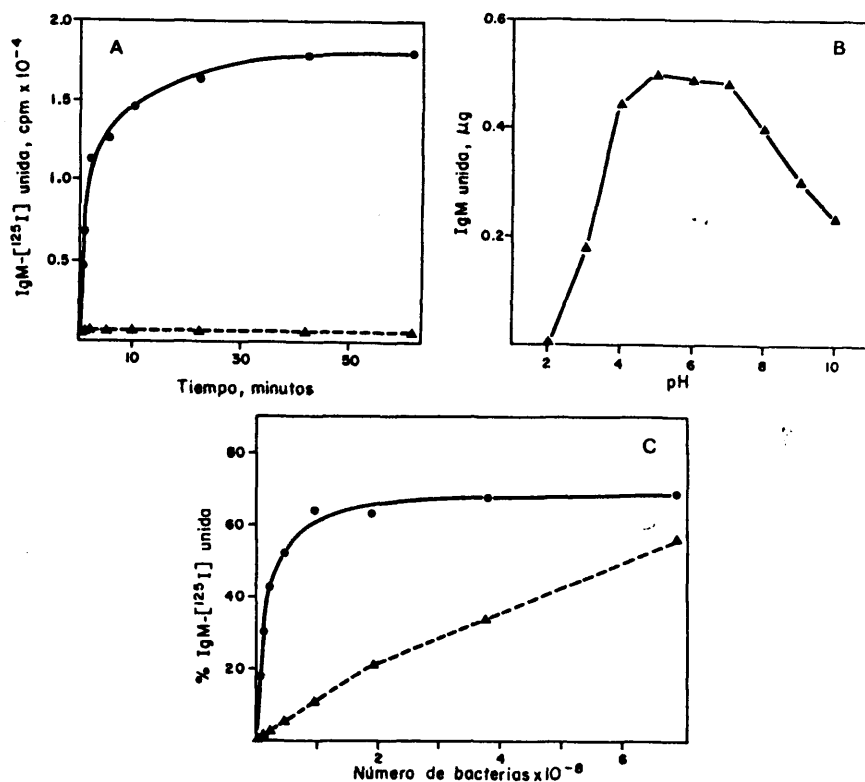


Figura III.7. Fijación directa de IgM-{¹²⁵I} policlonal a *S. aureus*.

A, cinética de la fijación de 0.3 μg de IgM{¹²⁵I} a 1.5 x 10⁸ células de *S. aureus* no tratadas (●) o digeridas con pepsina (▲).

B, Fijación de 1 μg de IgM{¹²⁵I} en 10 μl, a 140 μl de suspensiones de *S. aureus* conteniendo 1.5 x 10⁸ células en tampones de los pH indicados (II.9.1.)

C, fijación de 0.1 μg (●) o 3 μg (▲) de IgM{¹²⁵I} en función del número de bacterias, el cual se mantiene constante, sin embargo, añadiendo estafilococos digeridos con pepsina.

En este sistema los estafilococos unen un 60% de la IgM, figura III.7C., y esta fijación es proporcional al número de células de *S. aureus* presentes, como puede apreciarse en la misma figura, cuando la concentración de inmunoglobulina es saturante.

III.1.2.2. Determinación de la K_a del proceso de fijación y comparación con la correspondiente de IgG policlonal.

La IgM unida a un número constante de células de *S. aureus* en función de la concentración de inmunoglobulina, figura III.8., muestra la saturabilidad del proceso de fijación con el aumento de la cantidad de IgM presente, en tanto que la unión inespecífica se mantiene lineal, resultando ocupados todos los receptores de 1.5×10^8 células con 3 μ g de IgM.

El análisis gráfico de estos datos por el procedimiento de Scatchard (Scatchard, 1949), produce una representación lineal, esencialmente recta, figura III.9., sugiriendo que la fijación observada de IgM a los estafilococos ocurre a través de un único tipo de receptor y permite calcular una constante de asociación, K_a , para esta fijación, de 1×10^9 l/mol, valor superior a la mayoría de los estimados para la unión de IgG de conejo o de proteínas IgG monoclonales humanas, en el rango $50-0.5 \times 10^7$ l/mol (Kessler, 1975; Kronvall y col., 1970b).

El análisis de los datos de fijación de IgG humana

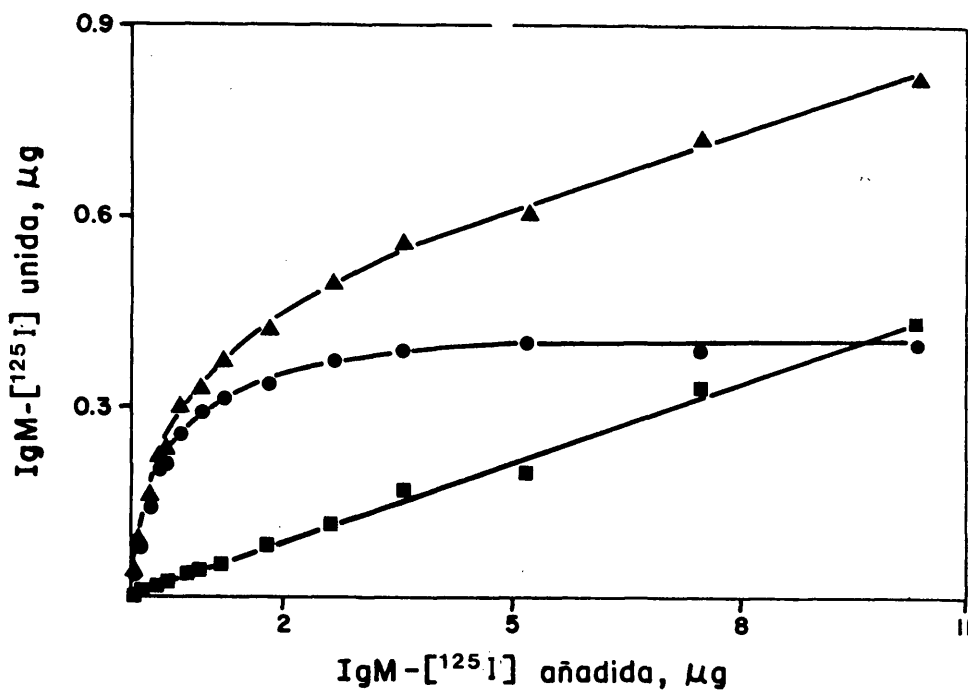


Figura III.8. Saturabilidad del proceso de fijación de IgM a *S. aureus*. Soluciones de concentración variable de IgM{¹²⁵I} , 7.7×10^{-8} - 4.1×10^{-10} M, se incuban en 150 μ l con 1.5×10^8 células no tratadas (▲) o digeridas con pepsina (■), durante 1 hora. La diferencia de la radiactividad fijada a una y otra preparación (●) se representa como fijación específica.

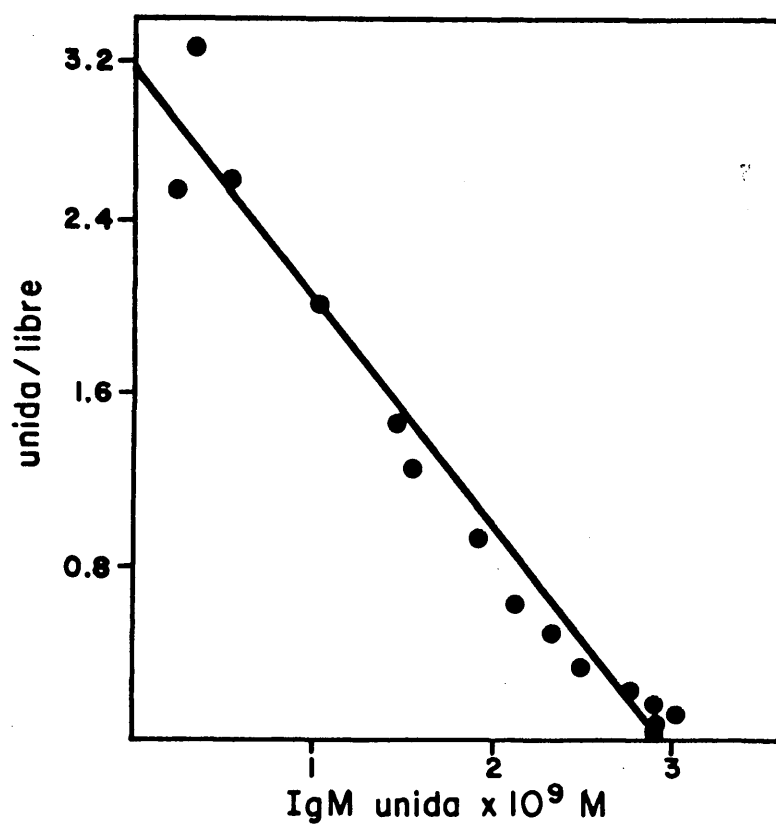


Figura III.9. Representación de Scatchard de los datos de fijación de cantidades variables de IgM policlonal a *S. aureus* (figura III.8.). La expresión de la recta de regresión es $y = -1.07x + 3.12$, y el coeficiente de correlación $r = -0.98$, con una $p < 0.001$ para 15 puntos (II.9.3.).

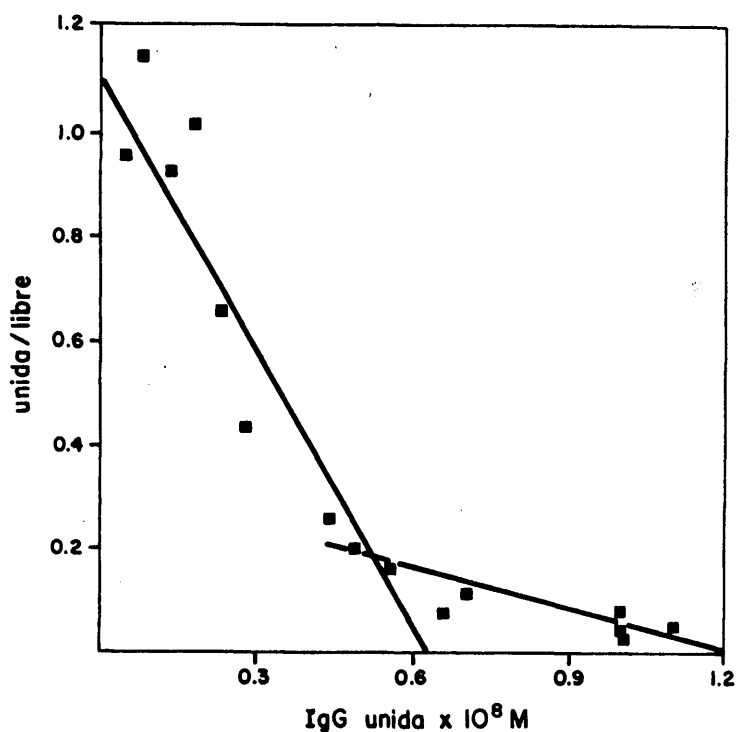


Figura III.10. Representación de Scatchard de los datos de fijación de cantidades variables de IgG a *S. aureus*. Soluciones de concentración variable de IgG{I¹²⁵} , $8.81 \times 10^{-7} \text{M}$ - $1.02 \times 10^{-9} \text{M}$, se incuban en $150 \mu\text{l}$ con 1.5×10^8 células de *S. aureus*, efectuando la representación a partir de las fracciones de IgG específicamente unida y libre, calculadas como se indica en II.9.3.. La expresión de la recta de regresión de mayor pendiente es $y = -0.16x + 1.09$, y la de la de menor pendiente $y = -0.03x + 0.32$. Los coeficientes de correlación respectivos son, $r = -0.92$, $p < 0.001$ para $n = 12$, y $r = -0.89$, $p < 0.005$ para $n = 9$.

policlonal en este sistema, produce una representación de Scatchard curvilínea, figura III.10., similar a las observadas en otros trabajos (Kronvall y col., 1970b; O'Keefe y Bennet, 1980), que se ha descompuesto de modo arbitrario en dos ramas rectas, supuestamente correspondientes a sendos procesos de fijación de distinta afinidad, tal como se indica en la misma figura, con K_a de 1.65×10^8 y 2.7×10^7 l/mol, respectivamente, en cualquier caso inferiores al valor calculado para la de la fijación de IgM.

III.1.2.3. Capacidades de unión de IgM e IgG por *S. aureus*.

Que el receptor considerado de IgM se encuentra en la molécula de PA, viene indicado no sólo porque la IgG policlonal es capaz de inhibir completamente su unión a los estafilococos, figura III.11A., sino que dicha fijación también resulta interferida en presencia de fragmentos Fab de anticuerpos contra la PA, figura III.11B., frente a lo apuntado por otros autores acerca de que debía ser otro el componente de la pared celular de *S. aureus* que fijaba IgM (Harboe y Folling, 1974).

Por otro lado, la menor actividad inhibidora de IgG respecto de la de IgM, figura III.11A., está de acuerdo con las distintas afinidades observadas para la fijación de una y otra inmunoglobulina a los estafilococos (III.1.2.2.).

Sin embargo, aparte la heterogeneidad observada en

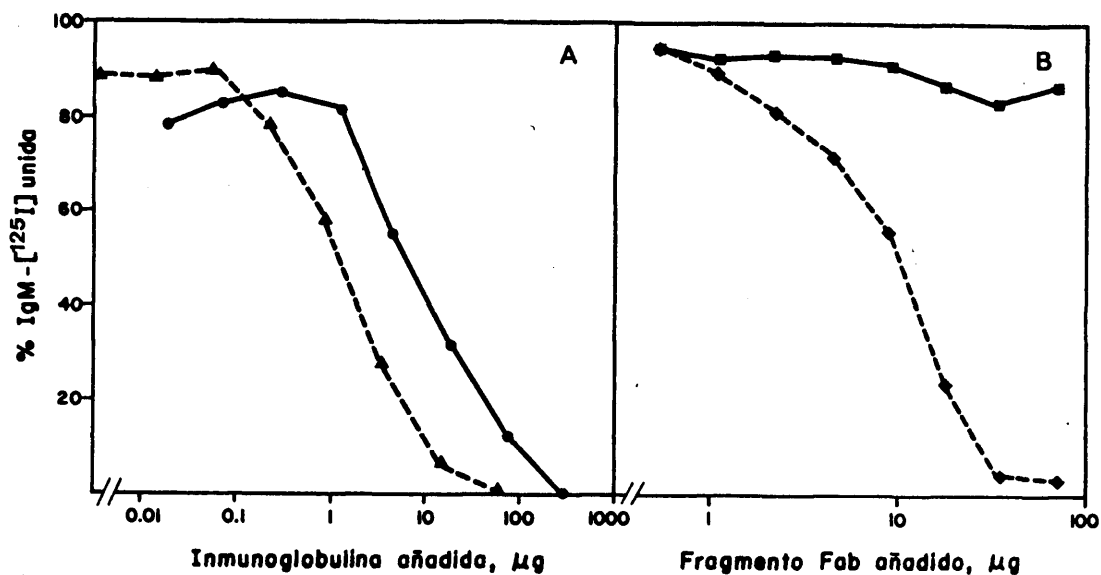


Figura III.11. Proteína A como receptor de *S. aureus* para IgM.

A, inhibición competitiva de la fijación de IgM{¹²⁵I} a *S. aureus*. Soluciones de concentración variable de IgM (▲) e IgG (●) se mezclan con 1 μg de IgM{¹²⁵I} en 100 μl y se añaden a tubos con 50 μl de una suspensión 0.2% de bacterias, v/v, representándose la fracción de IgM{¹²⁵I} unida tras 1 hora de incubación, calculada según II.9.1..

B, Inhibición de la fijación de IgM a *S. aureus* por anticuerpos anti-PA. Soluciones de concentración variable de Fab anti-PA (◆) o Fab no inmune (■), se mezclan con 1 μg de IgM{¹²⁵I} en 100 μl y tras 1 hora se añaden a tubos con 50 μl de una suspensión 0.2% de bacterias, v/v. La fracción de IgM{¹²⁵I} unida se calcula según II.9.1..

la fijación de IgG, la capacidad de unión de esta inmunoglobulina es superior a la de unión de IgM, calculadas a partir de las correspondientes representaciones de Scatchard (figuras III.9. y III.10.), 6-12 fmoles y 3 fmoles por 10^6 células, respectivamente.

En todo caso, el número de receptores por célula que resultaría, suponiendo un único sitio de unión por molécula de PA, $2-8 \times 10^3$, es mucho menor que el de 8×10^4 calculado de modo similar para células de la cepa Cowan I (Kronvall y col., 1970b). Esta discrepancia puede reflejar la conocida variabilidad del contenido en PA de los estafilococos, dependiendo del medio y condiciones de cultivo (Lind, 1974), pero, además, este último valor fue estimado con células frescas de una preparación que mostraba una rápida pérdida de capacidad de unión de IgG con el tiempo de almacenamiento (Kronvall y col., 1970b). Habría que considerar, asimismo, el posible efecto que los tratamientos de formalinización, liofilización, etc., pudieran tener sobre los componentes de la pared celular.

Esta menor capacidad de los estafilococos para unir IgM podría derivar de la no ocupación de todos los receptores presentes, por impedimentos estéricos relacionados con el mayor tamaño de su molécula, si bien hay que considerar alternativamente, o al tiempo, que por su estructura polimérica puede contener varios sitios de interacción por molécula de IgM, con lo que la diferencia en el número de receptores, del

modo en que se ha calculado, no sería real y, para la IgM, se hallaría infravalorado. Este fenómeno se manifiesta también en las distintas capacidades de fijación de IgM e IgG a columnas de PA-Sepharose, en torno de 2 y 12 mg/ml de gel, respectivamente (tabla III.1. y III.3.), una diferencia mayor que la observada con células de *S. aureus*. Hay que tener en cuenta, no obstante, que en la columna de afinidad, la PA se encuentra unida covalentemente a la agarosa por uno o varios de sus grupos amino (Pharmacia Fine Chemicals, 1979), en una disposición y densidad probablemente distintas de la correspondiente a la superficie de los estafilococos, en donde se encuentra en una uniformemente orientada, debido a su anclaje en la pared celular por su extremo C-terminal (Sjodahl, 1977a).

III.1.2.4. Efecto del fragmento $F(ab')_2\gamma$ sobre la fijación de IgM.

Cuando en los experimentos de inhibición competitiva de la fijación de IgM a células de *S. aureus* se utilizan fragmentos de IgG, figura III.12., resulta que la actividad observada para la molécula entera se conserva en su región $F(ab')_2\gamma$, la cual es capaz de inhibir completamente la unión de IgM a los estafilococos, mientras que para el fragmento $Fc\gamma$ se aprecia un débil efecto sólo a las mayores concentraciones ensayadas. La pequeña diferencia entre las actividades inhibitoras de IgG y $F(ab')_2\gamma$ puede reflejar el contenido en

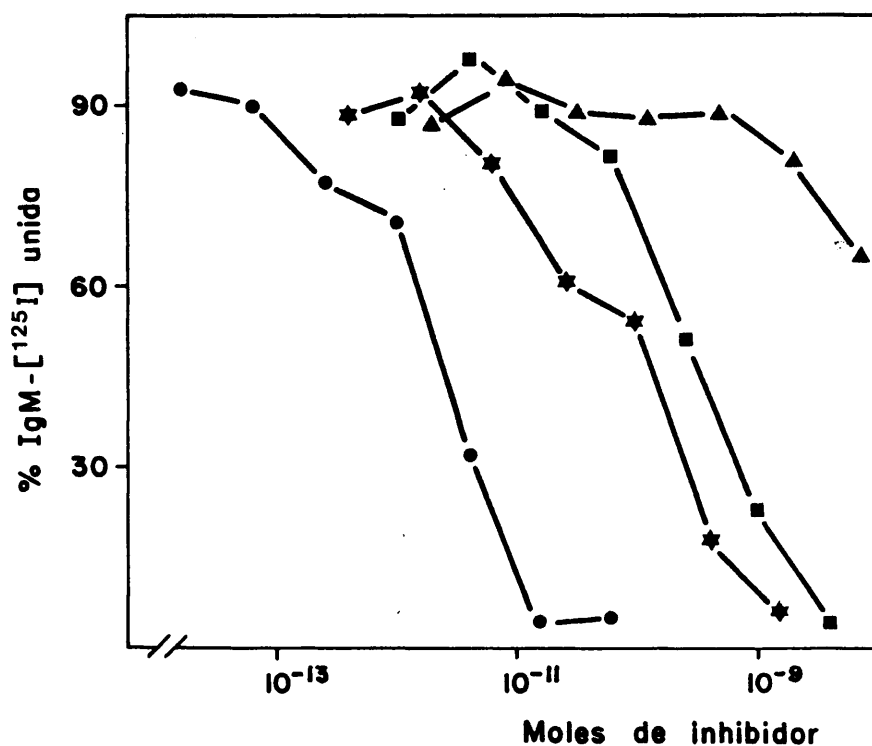


Figura III.12. Inhibición competitiva de la fijación de IgM a *S. aureus* por fragmentos de IgG. 100 μ l de soluciones de concentración variable de Fc γ (▲), F(ab')₂ γ (■), IgG (★) e IgM (●) se mezclan con 25 μ l de IgM-{¹²⁵I} 0.04 mg/ml, y a continuación se incuban durante 2 horas en tubos con 25 μ l de una suspensión 0.4% de bacterias, v/v, representándose la fracción de IgM-{¹²⁵I} unida, calculada como se indica en II.9.1..

en una y otra preparación de especies moleculares con estructuras reactivas en su región $F(ab')_2\gamma$, ya que por el modo en que se han obtenido podrían ser distintas.

Según estos resultados, la reactividad de la IgM policlonal humana con PA es similar a la descrita por Inganas para la IgE, y que sirvió para definir el mecanismo de interacción por medio de fragmentos $F(ab')_2$, a partir de que, como la observada aquí para IgM, la fijación de IgE a PA-Sepharose es inhibida por IgG y por $F(ab')_2\gamma$, pero no por el fragmento $Fc\gamma$ (Inganas y col., 1980).

III.1.3. Reacciones de coprecipitación y precipitación de IgM e IgG con proteína A.

III.1.3.1. Coprecipitación de IgM humana con proteína A y $Fc\gamma$.

La IgM policlonal interacciona con la PA formando complejos insolubles en presencia del fragmento $Fc\gamma$ humano, como se muestra en la figura III.13A., en una reacción de coprecipitación similar a las descritas para IgM de mieloma con IgG de conejo en agarosa (Groß, 1975a) o también con $Fc\gamma$ en soluciones con PEG (Inganas y Johansson, 1981). En las condiciones empleadas, la ausencia de cualquiera de las tres proteínas determina la no formación de agregados precipitables (figura III.13A.).

Estos complejos contienen, en la región de la curva

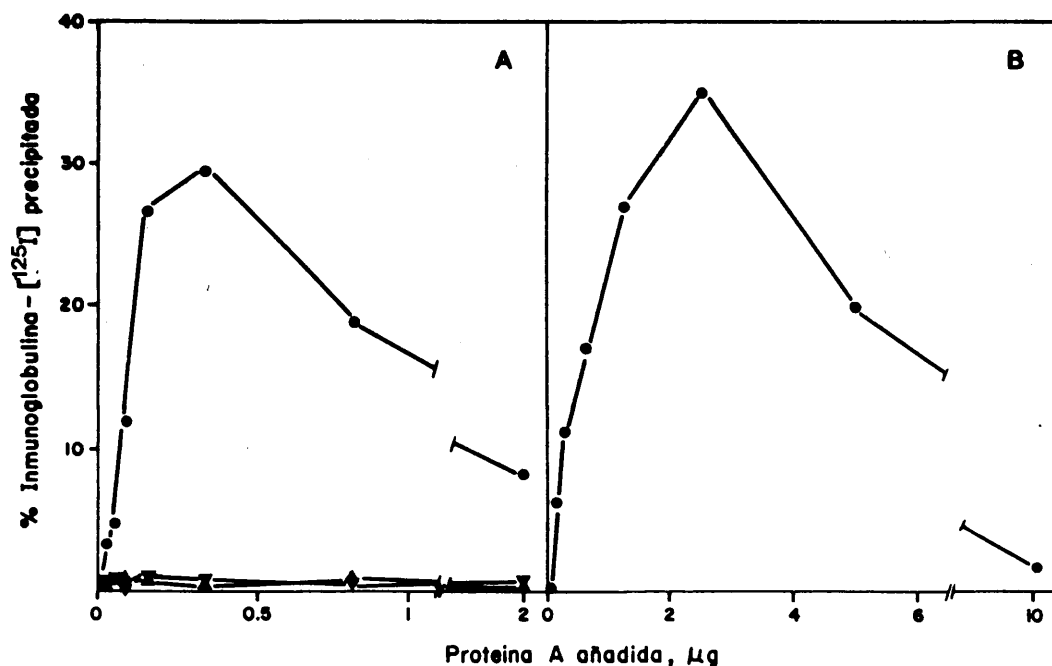


Figura III.13. Reacciones de coprecipitación de IgM y de precipitación directa de IgG con proteína A.

A, fracciones de IgM precipitadas en la incubación de 50 μl de IgM(^{125}I) 0.02 mg/ml y Fc γ 0.04 mg/ml con 100 μl de soluciones de concentración variable de PA (●), calculadas según II.9.4.. Se muestra asimismo las correspondientes de Fc γ (^{125}I) e IgM(^{125}I) precipitadas en ausencia de IgM (▲) y Fc γ (▼), respectivamente.

B, fracciones de IgG(^{125}I) en 25 μl de soluciones 0.8 mg/ml precipitadas en presencia de 100 μl de soluciones de concentración variable de PA, calculadas según II.9.4..

de máxima precipitación, 6-7 moléculas de PA por molécula de IgM, figura III.14., mostrando, además de la multivalencia de la IgM, una composición bien diferente de la de los formados en la precipitación de PA e IgG policlonal humana, en los que la relación molar de ambos componentes es 1:2 (Sjoquist y col., 1972a).

La magnitud de la precipitación es dependiente de la concentración relativa de cada una de las proteínas interesadas. Así, para las cantidades fijadas de IgM y Fc γ de la figura III.13A., pueden distinguirse condiciones de aparente exceso de IgM, a la izquierda del máximo de la curva de precipitación, y de exceso de PA a su derecha, en las que deben tenerse, fundamentalmente, complejos solubles.

El efecto estimulante de la precipitación debido al fragmento Fc γ se muestra en la figura III.14., en la que se han representado las fracciones de IgM y PA que se encuentran en los complejos formados al variar las concentraciones de Fc γ . No obstante, cuando se supera la relación de 11 moles de Fc γ por mol de PA, la precipitación empieza a disminuir, en un comportamiento que puede ser comparado con la inhibición que produce en la reacción de precipitación directa de IgG y PA (Kronvall y Frommel, 1970; Inganas y Johansson, 1981). Esta actividad podría estar asociada a algún efecto sobre el tamaño de los complejos formados en presencia de esas concentraciones de Fc γ , ya que en los que aún precipitan, la relación

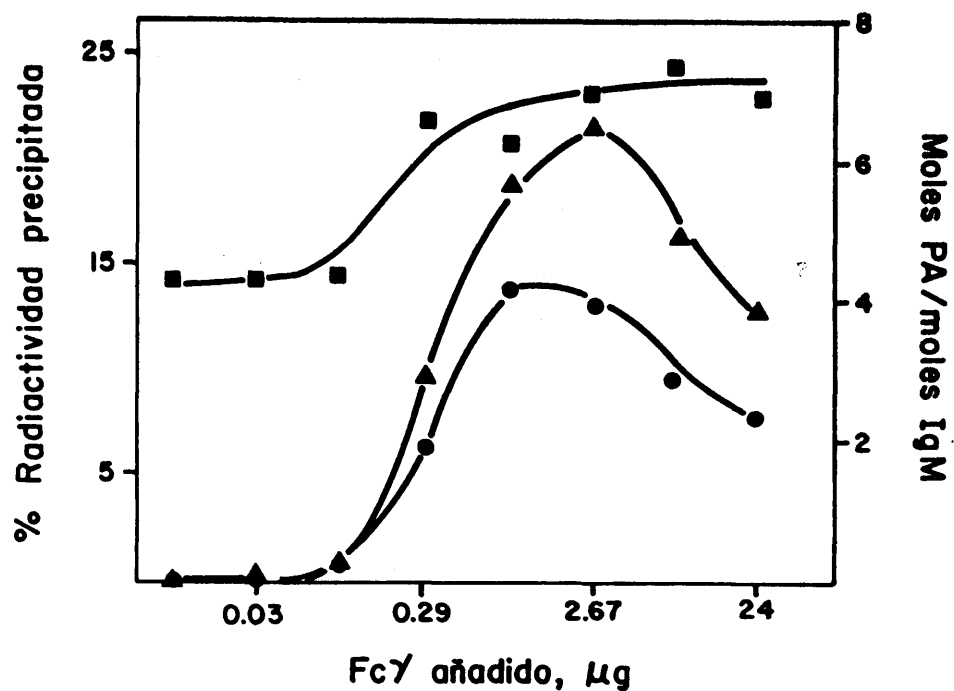


Figura III.14. Coprecipitación de IgM, Fc γ y proteína A en función de la concentración de Fc γ . Se ha representado la fracción de radiactividad precipitada, según II.9.4., en la mezcla de 50 μl de IgM, 20 $\mu\text{g/ml}$ y 50 μl de PA, 4 $\mu\text{g/ml}$, con 50 μl de soluciones de concentración variable de Fc γ , en tubos con IgM(^{125}I) (●) o PA(^{125}I) (▲), así como la relación molar PA/IgM(■) en los complejos precipitados. Tubos sin Fc γ indican la inespecificidad del ensayo.

IgM:PA se mantiene inalterada, figura III.14..

Hay que destacar lo paradójico de la actividad del fragmento Fc γ en la interacción de inmunoglobulinas y PA en solución, ya que si por un lado inhibe la reacción de precipitación directa (Kronvall y Frommel, 1970), la formación de complejos precipitables de la reacción de coprecipitación con PA de inmunoglobulinas no precipitantes (Grosvold y Endresen, 1976) o de fragmentos F(ab')₂ (Inganäs y Johansson, 1981), requieren su presencia.

Puesto que los agregados correspondientes a la máxima precipitación, la relación molar PA:Fc γ calculada es de 1:3, resultado que se halla de acuerdo con la monovalencia funcional de este fragmento en su interacción con la PA (Inganäs y Johansson, 1981), ésta ha de poseer en su molécula más de un sitio de unión de IgM, y así hacer posible la polimerización que produce los grandes complejos insolubles. Esto haría posible entonces que la sola asociación de IgM y PA condujera a agregados precipitables en ausencia de Fc γ , pero éstos sólo se han observado en presencia de PEG, en un efecto estimulante de precipitación similar a los observados para este compuesto con inmunocomplejos (Johansson y col., 1980).

III.1.3.2. Precipitación directa de IgM con proteína A.

Así, en la figura III.15., puede observarse cómo todas las fracciones de IgM eluidas de PA-Sepharose con tam-

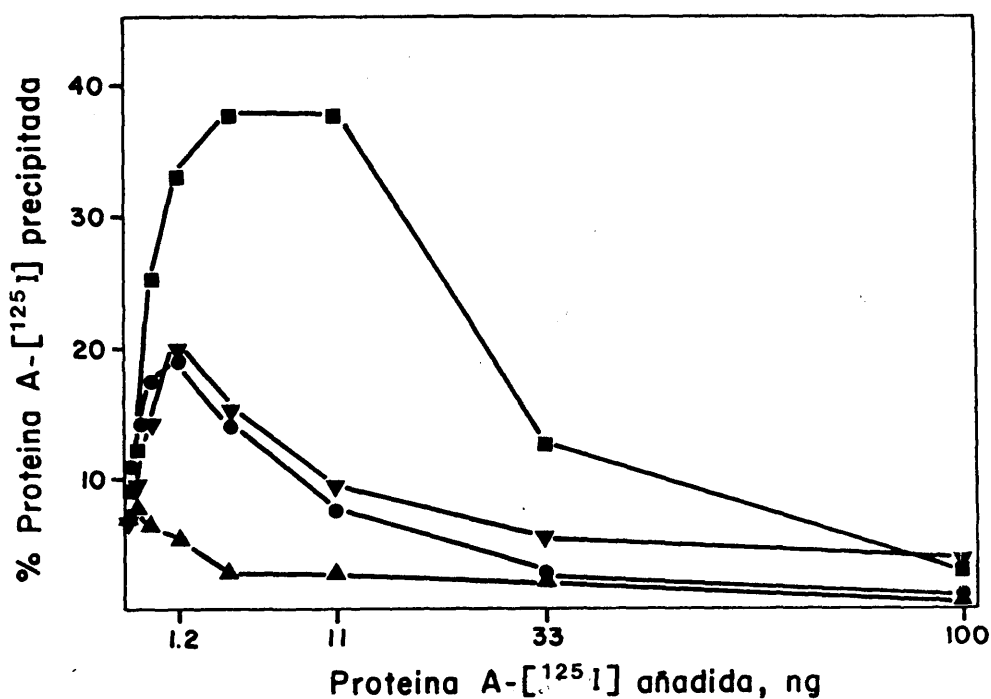


Figura III.15. Precipitación directa de IgM policlonal y proteína A. Se representan las fracciones de PA $[^{125}\text{I}]$ precipitadas, según II.9.2.4., en la incubación de 100 μl de soluciones conteniendo 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IgM eluida de PA-Sepharose a pH 4.4 (●), pH 4.0 (▼), pH 3.4 (■) y pH 2.5 (▲), con 50 μl de soluciones de concentración variable de PA $[^{125}\text{I}]$ de actividad específica constante, en tampón Tris-HCl 0.05M, pH 7.6, NaCl 0.12M, 0.1% Tween 20, v/v y 3% PEG 6000, p/v.

pones de acidez creciente dan complejos precipitables con PA, en un medio con PEG, si bien la capacidad de formación de agregados para cada una de ellas es bien diferente. Se puede pensar entonces, que en las reacciones de coprecipitación cabría cierta heterogeneidad en los complejos, de modo que la estimación de 6-7 moléculas de PA por molécula de IgM en los mismos, podría representar un valor promedio de los correspondientes a agregados de otra estequiometría.

III.1.3.3. Precipitación directa de IgG con proteína A.

Por el contrario, no todas las fracciones de IgG obtenidas de su cromatografía en PA-Sepharose forman complejos precipitables con PA, ya que, como puede observarse en la figura III.16., sólo los producen aquellas eluidas con los pH más ácidos, e incluso su contenido en especies precipitantes es variable, llegando a comprender el 85% de la IgG en una de ellas, lo cual es un enriquecimiento notable, si se tiene en cuenta que en el conjunto de IgG no pasa del 35%, figura III.13B., o incluso del 45% descrito utilizando concentraciones mucho mayores de PA e IgG (Sjoquist y col., 1972a).

Esta diversidad en la formación de complejos con PA se contempla también en proteínas IgG de mieloma, de las que la fracción precipitante de alguna de ellas es dos y hasta tres veces mayor que la de IgG policlonal (Kronvall y col., 1970d).

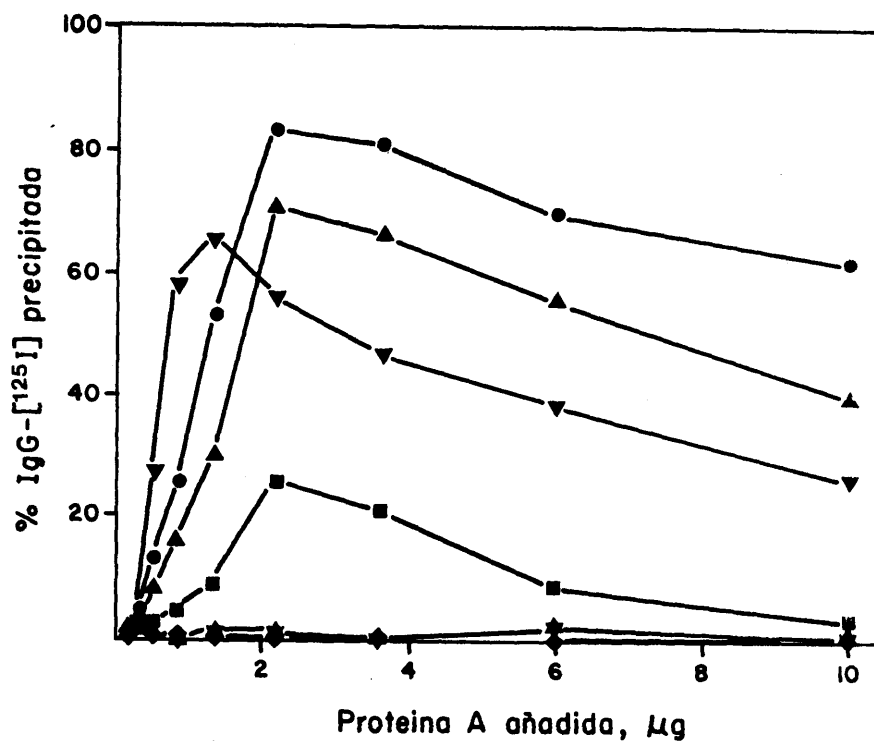


Figura III.16. Precipitación directa con proteína A de fracciones de IgG policlonal obtenidas de PA-Sepharose. 100 μl de soluciones 0.2 mg/ml de IgG eluida de PA-Sepharose a pH 6.1 (◆), pH 5.1 (★), pH 4.4 (■), pH 4.0 (▲), pH 3.4 (●) y pH 2.5 (▼), conteniendo 100-200000 cpm de cada una de esas fracciones marcadas con ^{125}I , se mezclan con 50 μl de soluciones de concentración variable de PA, representándose la radiactividad precipitada, según II.9.4..

Las fracciones no precipitantes eluidas de PA-Sepharose con los tampones menos ácidos, deben corresponder a las proteínas con reactividad tipo inhibidor de la reacción de precipitación, pues aunque en mezclas equimolares con IgG de las fracciones precipitantes aparecen mezcladas en los mismos complejos, figura III.17., para las mayores concentraciones de PA puede observarse un efecto inhibidor de precipitación, si se comparan las curvas con las de la figura III.16.. El doble marcaje permite, asimismo, apreciar cómo los complejos formados en presencia de las concentraciones más bajas de PA se hallan particularmente enriquecidos en IgG precipitante.

III.2. SITIOS DE PROTEÍNA A PARA LAS REACTIVIDADES CLÁSICA Y ALTERNATIVA

III.2.1. Receptores de proteína A para $F(ab')_2\gamma$ y $Fc\gamma$.

De acuerdo con la diferencia de actividades de los fragmentos $F(ab')_2\gamma$ y $Fc\gamma$ sobre la fijación de IgM a *S. aureus* (figura III.12.), la unión de $F(ab')_2\gamma$ es afectada débilmente por $Fc\gamma$, que produce una inhibición gradual, aunque incompleta, a diferencia de la IgG y el propio fragmento $F(ab')_2\gamma$, figura III.18., cuya actividad en este ensayo es, sin embargo, menor que la de la molécula de IgG intacta.

Recíprocamente, la fijación de $Fc\gamma$ a los estafilococos es interferida parcialmente por $F(ab')_2\gamma$, en tanto que

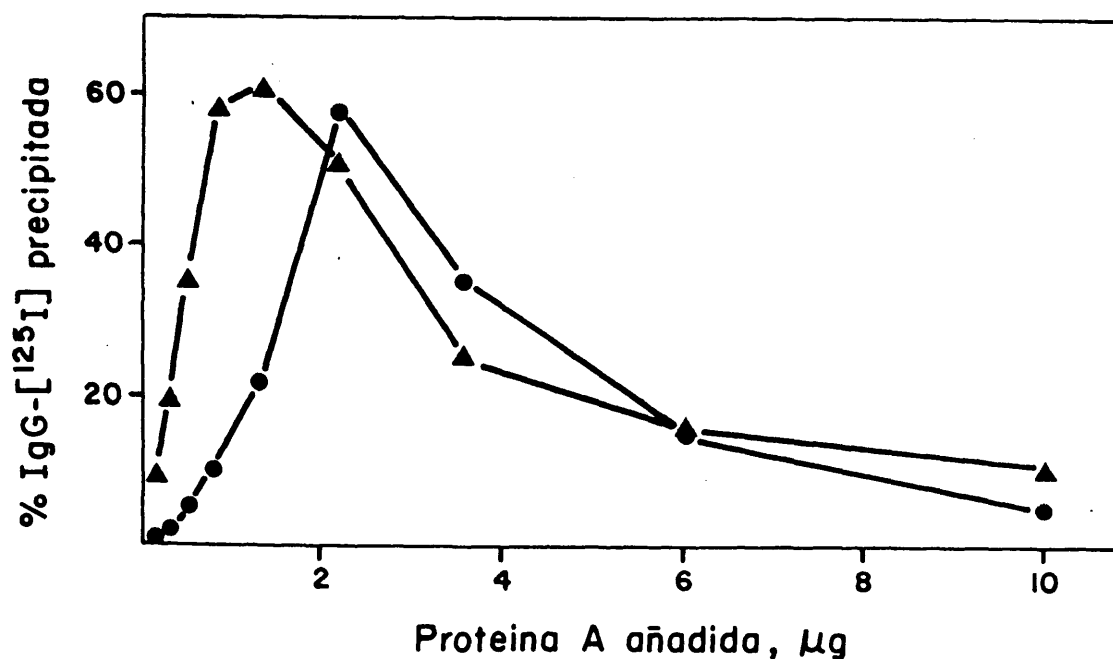


Figura III.17. Coprecipitación de IgG no precipitante con proteína A, en presencia de IgG precipitante y proteína A. 50 μl de soluciones de concentración variable de PA se incuban con 100 μl de una de IgG 0.2 mg/ml que contiene cantidades iguales de IgG eluida de PA-Sepharose a pH 5.1 y de IgG eluida a pH 3.4. Se representa la radiactividad precipitada asociada a complejos con IgG{ ^{125}I } de pH 5.1 (●) o con IgG{ ^{125}I } de pH 3.4 (▲), calculada según II.9.4..

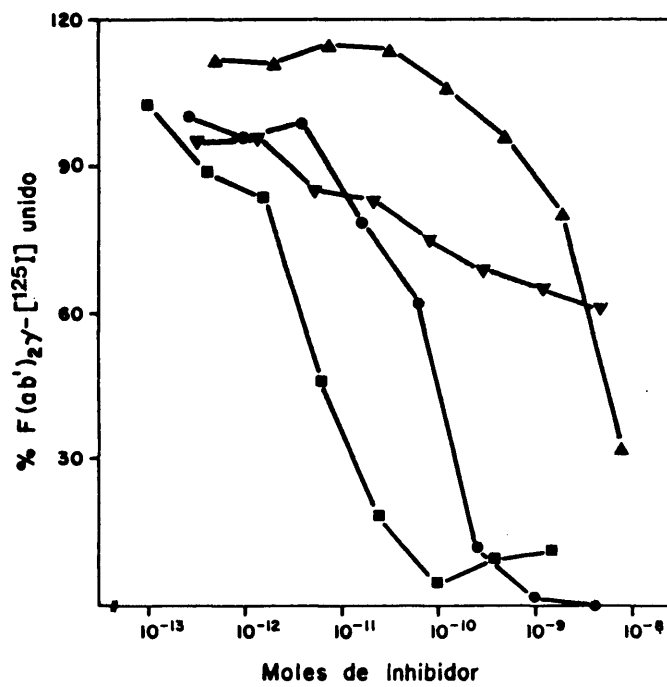


Figura III.18. Inhibición competitiva de la fijación de $F(ab')_2\gamma\{^{125}I\}$ a *S. aureus* por fragmentos de IgG. 100 μ l de soluciones de concentración variable de $Fab\gamma$ (▲), $F(ab')_2\gamma$ (●), $Fc\gamma$ (▼) e IgG (■), se mezclan con 25 μ l de $F(ab')_2\gamma\{^{125}I\}$ 60 μ g/ml, y a continuación se incuban con 25 μ l de una suspensión de bacterias 0.6%, v/v, durante 2 horas. La fracción de $F(ab')_2\gamma$ unida representada se ha calculado según II.9.1.

la IgG intacta o el mismo Fc γ , producen una inhibición equivalente y completa, como muestra la figura III.19.. Esta actividad del fragmento F(ab') $_2\gamma$ es similar a las observadas en la fijación de Fc γ a PA-Sepharose (Inganas y col., 1980; Inganas, 1981) y en la de PA a Fc γ insolubilizado en plástico (Biguzzi, 1982), para F(ab') $_2\gamma$ policlonal y de algunas proteínas de mieloma.

La existencia en la molécula de IgG de dos estructuras capaces de interaccionar con PA se manifiesta, de nuevo, cuando se considera su fijación a los estafilococos en presencia de sus fragmentos F(ab') $_2\gamma$ y Fc γ que, por separado, aparecen con actividades inhibitoras menores que las de la IgG, figura III.20.. Asimismo, puede observarse la distinta naturaleza de los efectos inhibidores de cada fragmento, que para el Fc γ es apreciable a concentraciones mucho menores que a las que se produce el de F(ab') $_2\gamma$. Por otra parte, las pendientes de las curvas obtenidas también son diferentes, siendo la inhibición debida al fragmento Fc γ gradual y más incompleta que la correspondiente de F(ab') $_2\gamma$, en relación, quizá, con la mayor sensibilidad que muestra la unión a los estafilococos del fragmento Fc γ a la presencia de F(ab') $_2\gamma$.

Estos resultados permiten entender la complejidad observada en la interacción de IgG con los estafilococos, de modo que la fijación a través de estructuras de Fc γ o F(ab') $_2\gamma$, sea lo que tal vez de lugar a representaciones de Scatchard

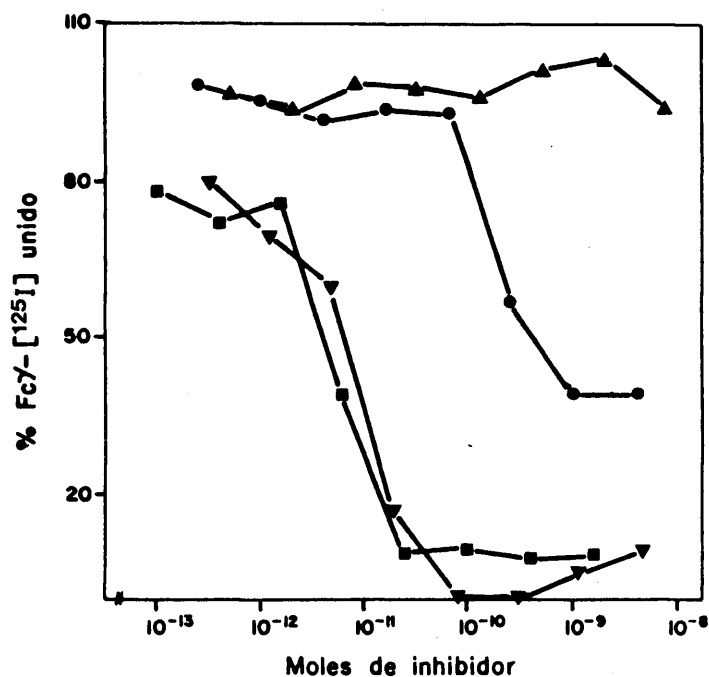


Figura III.19. Inhibición competitiva de la fijación de $\text{Fc}\gamma\{^{125}\text{I}\}$ a *S. aureus* por fragmentos de IgG. 100 μl de soluciones de concentración variable de $\text{F(ab}')_2\gamma$ (▲), $\text{F(ab')}_2\gamma$ (●), $\text{Fc}\gamma$ (▼) e IgG (■), se mezclan con 25 μl de $\text{Fc}\gamma\{^{125}\text{I}\}$ 80 $\mu\text{g/ml}$, y a continuación se incuban con 25 μl de una suspensión de bacterias 0.6%, v/v, durante 2 horas. La fracción de $\text{Fc}\gamma\{^{125}\text{I}\}$ unida representada se ha calculado según II.9.1.

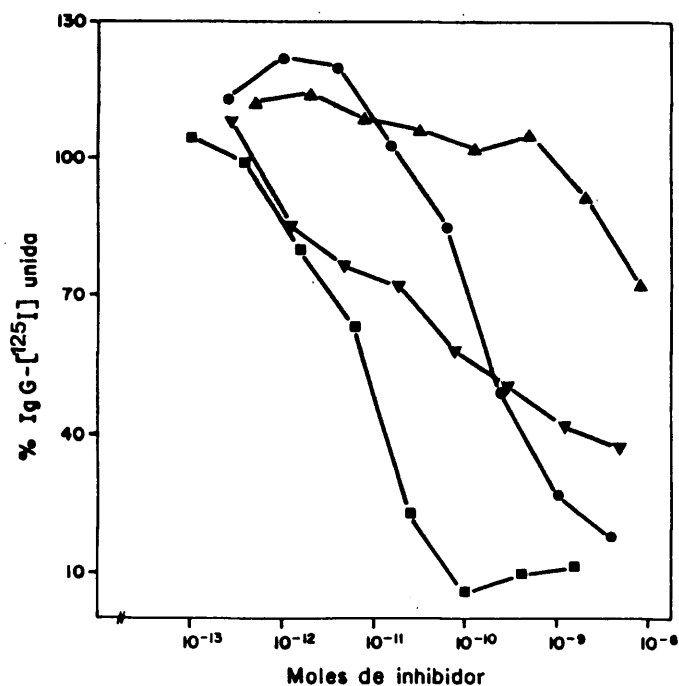


Figura III.20. Inhibición competitiva de la fijación de $\text{IgG}\{^{125}\text{I}\}$ a *S. aureus* por fragmentos de IgG. 100 μl de soluciones de concentración variable de Faby (▲), $\text{F(ab')}_2\gamma$ (●), $\text{Fc}\gamma$ (▼) e IgG (■), se mezclan con 25 μl de $\text{IgG}\{^{125}\text{I}\}$, 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y a continuación se incuban con 25 μl de una suspensión de bacterias 0.4%, v/v. La fracción de $\text{IgG}\{^{125}\text{I}\}$ unida representada se ha calculado según II.9.1.

curvilíneas como la obtenida, figura III.10.. De este modo, si el rango empleado de concentraciones de IgG es suficientemente amplio, puede observarse el proceso de fijación de menor afinidad, a través de estructuras en la región $F(ab')_2\gamma$, cuando comienza a completarse el otro proceso de unión de mayor afinidad, con cantidades menores de IgG. Quizá por ello resulten similares las K_a de fijación a *S. aureus* de IgG de mieloma precipitantes e inhibidoras de precipitación (Kronvall y col., 1970b), a pesar de que las precipitantes muestren también reactividad a través de sus regiones $F(ab')_2\gamma$ (III.4.4.; Inganas y Johansson, 1981).

De este modo, la identidad entre los sitios de PA que unen IgM y $F(ab')_2\gamma$, sólo o formando parte de la IgG (III.1.2.4.), junto al débil efecto del fragmento $Fc\gamma$ sobre la fijación de IgM o IgE a la PA, sugiere que los dos mecanismos de interacción descritos, a través del $Fc\gamma$ y de la región $F(ab')_2$ (Inganas y col., 1980), deben hallarse mediados por estructuras receptoras de la molécula de PA distintas, que pudieran ser no totalmente independientes, a la vista de las interferencias recíprocas parciales observadas en los procesos de unión de $F(ab')_2\gamma$ y $Fc\gamma$, aunque lo suficiente para constituir la causa de las distintas capacidades observadas para la fijación de IgG e IgM a las células de *S. aureus* (III.1.2.3.).

III.2.2. Actividad del fragmento Fab γ en los ensayos de fijación a *S. aureus*.

En todos estos experimentos se estudia también el comportamiento del fragmento Fab γ , que como puede apreciarse en las figuras III.18., III.20. y III.21., actúa como muy débil inhibidor de las fijaciones de F(ab') $_2\gamma$, IgG e IgM, respectivamente, sin afectar, en cambio, la de Fc γ (figura III.19.).

Aunque la fijación de F(ab') $_2\gamma$ es la más sensible a la presencia de Fab γ , la potencia inhibidora de este fragmento es mucho menor que la manifestada en cada caso por el F(ab') $_2\gamma$, lo que conduce a plantearse qué implicaciones pudiera tener la región gozne de la molécula de IgG en su unión a la PA por este mecanismo alternativo relacionado con la interacción a través de sus regiones F(ab') $_2$.

Para examinar esta cuestión se prepararon por reducción parcial del F(ab') $_2\gamma$ los fragmentos Fab' γ , los cuales, como se aprecia en la figura III.21., muestran una potencia inhibidora de la fijación de IgM a los estafilococos equivalente a la de los fragmentos Fab γ , de modo que, respecto de la competición con IgM por sus sitios de unión en PA, parece indiferente la presencia del péptido de la región gozne resultando esencial, por el contrario, el mantenimiento de tal región intacta, en la forma que se encuentra en la molécula de IgG o de F(ab') $_2\gamma$, para preservar sus respectivas

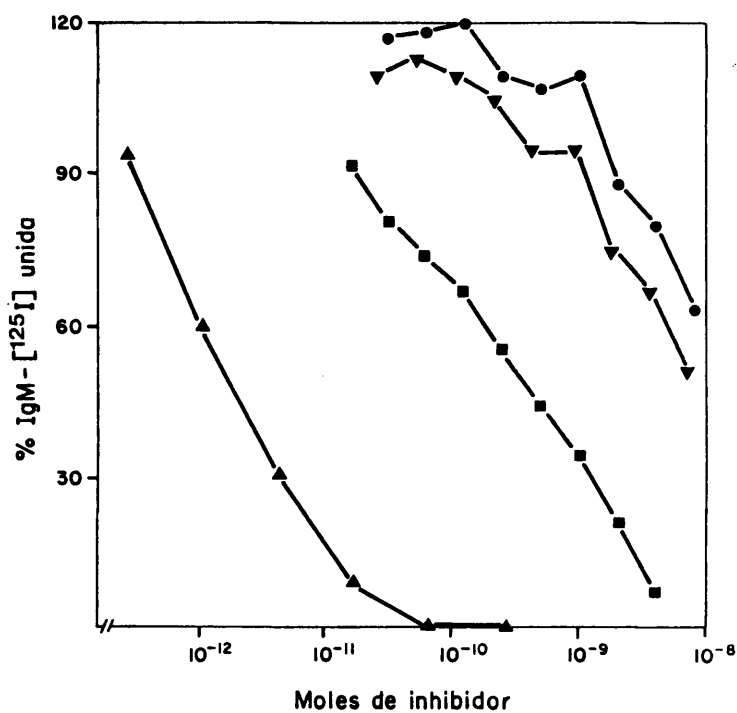


Figura III.21. Efecto de la reducción parcial de $F(ab')_2\gamma$ sobre su actividad inhibidora de la fijación de $IgM\{^{125}I\}$ a *S. aureus*. 100 μ l de soluciones de concentración variable de $Faby$ (●), $F(ab')_2\gamma$ (■), $Fab'\gamma$ (▼) e IgM (▲) se mezclan con 25 μ l de $IgM\{^{125}I\}$ 40 μ g/ml, y a continuación se incuban con 25 μ l de una suspensión de bacterias 0.4%, v/v. La fracción de $IgM\{^{125}I\}$ unida representada se ha calculado según II.9.1.

afinidades por la PA, como indica la disminución de actividad inhibidora observada para el Fab' γ .

III.2.3. Inhibición de la reacción de coprecipitación de IgM, Fc γ y proteína A.

La dualidad señalada de sitios receptores, se aprecia, asimismo, en la reacción de coprecipitación de IgM con PA y Fc γ , la cual resulta inhibida por el fragmento Fab γ , tal como aparece en la figura III.22., mientras que la región F(ab') $_2\gamma$ sólo lo hace levemente, produciendo incluso, una estimulación de la misma a las menores concentraciones, mostrando que el efecto del fragmento Fab γ no se debe a una posible interferencia con la unión de Fc γ a PA.

Este resultado puede interpretarse suponiendo que la IgM es desplazada de su sitio de unión en la molécula de PA al ser ocupado por el fragmento Fab γ , el cual, en su interacción se comportaría como monovalente, deshaciendo los agregados que pudieran formarse, al contrario que el F(ab') $_2\gamma$, el cual no inhibe esta reacción, probablemente, por llevar en su molécula dos sitios de interacción con PA, uno en cada Fab' γ , por lo que participaría en los complejos precipitables, hasta que a altas concentraciones sustituyese en los mismos a la IgM, obteniéndose así una menor cantidad de radiactividad precipitada.

Acerca de la localización en estos fragmentos de la

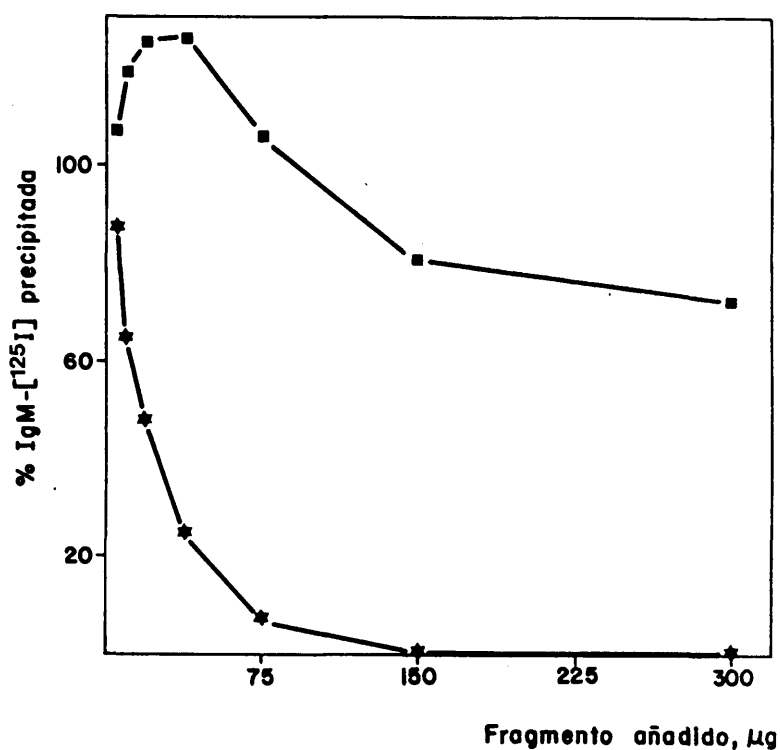


Figura III.22. Inhibición de la reacción de coprecipitación de IgM con proteína A y Fc γ . 25 μl de una solución de IgM{ ^{125}I }, 0.04 mg/ml y Fc γ 0.08 mg/ml, se mezclan con 100 μl de soluciones de inhibidores conteniendo cantidades variables de F(ab') $_2$ γ (■) o Fab γ (★), y se añaden a tubos con 25 μl de PA, 0.012 mg/ml, representándose las fracciones de IgM { ^{125}I }precipitada, según II.9.4.

estructura a través de la cual se unen a la PA, estos resultados sugieren que si en el Fab γ es única, y doble en el F(ab') $_2\gamma$, la presencia de la región gozne no debe ser determinante en esta interacción, tal como también se deducía de la actividad del fragmento Fab' γ (figura III.21.). Además, esta reactividad alternativa a través de sitios en F(ab') $_2$ se presenta en inmunoglobulinas que, como IgE e IgM, carecen de región gozne (Putnam, 1977a).

III.2.4. Efecto de la proteólisis de *S. aureus* sobre su interacción con inmunoglobulinas.

Abundando en la existencia de distintos sitios receptores de IgG en la molécula de PA, la figura III.23., muestra el efecto de la proteólisis gradual de células de *S. aureus* con tripsina y pepsina sobre la fijación de IgM, IgG, F(ab') $_2\gamma$ y Fc γ , consistente en una disminución progresiva de su capacidad de unión de los distintos ligandos ensayados. La probable destrucción de PA es más acusada cuando la proteasa utilizada es pepsina, figura III.23B, pero aparte esto, el efecto del tratamiento con ambas enzimas respecto de la fijación residual para cada ligando es similar: la unión de IgM y la de F(ab') $_2\gamma$ resulta afectada, pero menos que la de IgG y que, sobre todo, la de Fc γ .

La cantidad de PA presente en cada punto del tratamiento puede controlarse siguiendo la variación de la fijación

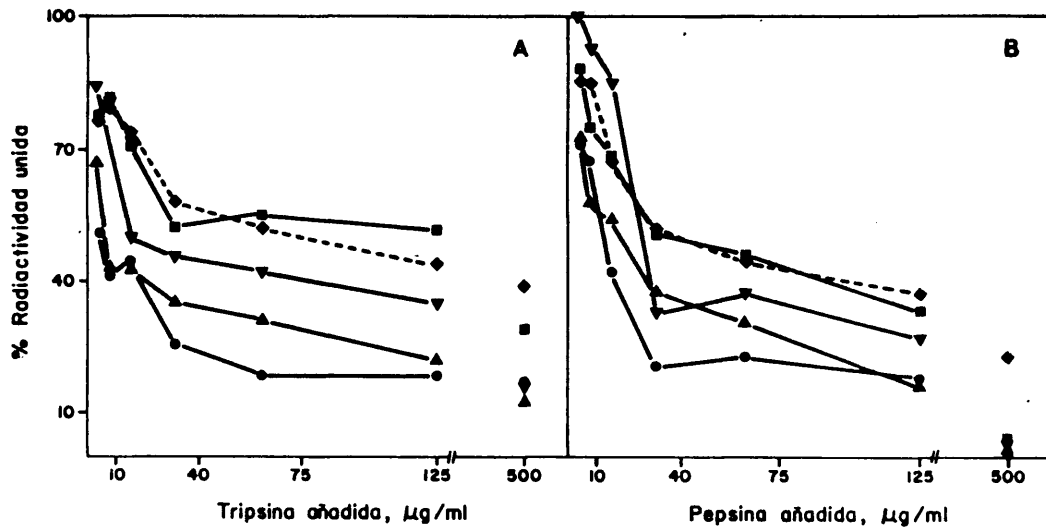


Figura III.23. Efecto de la proteólisis de *S. aureus* sobre su capacidad de unión de IgM, IgG y fragmentos de IgG. 100 µl de suspensiones de bacterias 0.2%, v/v, tratadas con cantidades variables de tripsina (A) o pepsina (B) como se indica en II.9.1., se mezclan con 50 µl de soluciones que contienen 0.5 µg de IgM{¹²⁵I} (■), 0.2 µg de Fcγ{¹²⁵I} (●), 0.7 µg de IgG {¹²⁵I} (▲), 1.5 µg de F(ab')₂γ {¹²⁵I} (△) o fragmentos Fab anti-PA marcados con ¹²⁵I (◆), representándose las fracciones de radiactividad unida tras 2 horas de incubación, respecto de las fijadas por un número igual de células no tratadas.

a los estafilococos de fragmentos Fab monoespecíficos contra PA, admitiendo la suposición de que la especificidad de la población de anticuerpos inducida en la inmunización no se halla desequilibrada, con una desigual distribución de los distintos anticuerpos hacia uno o pocos determinantes de la PA, así como que éstos se disponen de modo relativamente uniforme en el conjunto de la molécula.

Los resultados muestran, figura III.23., que la pérdida moderada de sitios antigénicos, estimada a partir de la cantidad de Fab anti-PA unido, va acompañada de una reducción importante en la capacidad de fijación del fragmento Fc γ e IgG, sobre todo, y también, pero menos pronunciada, de las correspondientes de IgM y F(ab') $_2\gamma$.

III.2.5. Efecto de anticuerpos anti-proteína A sobre la capacidad de fijación de inmunoglobulinas a *S. aureus*.

Análogamente, cuando se estudia el efecto del bloqueo de sitios antigénicos de la PA por fragmentos Fab anti-PA sobre la fijación a los estafilococos de los mismos ligandos. puede observarse, figura III.24., que la unión de IgM y F(ab') $_2\gamma$ es más sensible a la presencia de estos anticuerpos que la de Fc γ , la menos afectada, o la de IgG, que es inhibida en grado intermedio respecto de las otras.

La interpretación de estos resultados, sin embargo, ha de ser muy cuidadosa, pues además del hecho ya citado de la

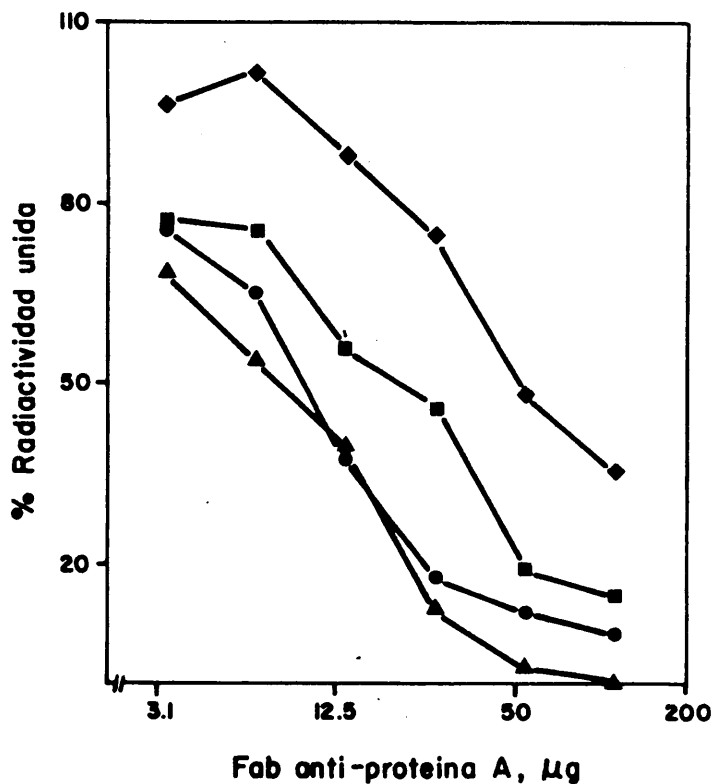


Figura III.24. Relación entre antigenicidad de la proteína A y sus sitios de unión de Fcγ y F(ab')₂γ. 25 µl de IgG{¹²⁵I}, 0.024 mg/ml (■), de Fcγ{¹²⁵I}, 0.008 mg/ml (◆), de F(ab')₂γ{¹²⁵I}, 0.048 mg/ml (▲) o de IgM{¹²⁵I} 0.04 mg/ml (●), se preincubaban durante 2 horas con 100 µl de soluciones de concentración variable de fragmentos Fab anti-PA, en tubos de microfuga a los que se añaden después 25 µl de una suspensión 0.4%, v/v, de estafilococos. La fracción de radiactividad unida se calcula respecto de la máxima fijada, observada en la incubación con fragmentos Fab de IgG de conejo no inmune.

posible diferencia de concentraciones de fragmentos Fab contra uno u otro determinante antigénico, la naturaleza del ensayo obliga a considerar las distintas afinidades de las inmunoglobulinas por sus receptores en PA o la del mismo receptor, como sitio antigénico o parte de él, por su Fab específico, así como el efecto que sobre la afinidad de la PA por cualquiera de las inmunoglobulinas o sus fragmentos pudiera tener el bloqueo de determinantes antigénicos no relacionados con los verdaderos sitios de unión de las mismas.

Entre estos resultados y los obtenidos con células parcialmente digeridas con proteasas, existe, no obstante, una correspondencia determinada por la relación que parece existir entre la configuración antigénica de la PA y las regiones de su molécula que unen IgM y $F(ab')_2\gamma$, mientras que la capacidad de fijación de $Fc\gamma$ muestra una mayor independencia de los sitios antigénicos de la PA.

Así, a una mayor integridad antigénica se halla asociada una fijación de $F(ab')_2\gamma$ cuantitativamente mayor que la de $Fc\gamma$, figura III.23., al tiempo, que por lo mismo, es inhibida mucho más efectivamente por los fragmentos Fab anti-PA que la de $Fc\gamma$, la cual resulta afectada sólo parcialmente. El comportamiento de la IgG en estos experimentos, intermedio entre los de IgM o $F(ab')_2\gamma$ y el de $Fc\gamma$, puede deberse, posiblemente, a su interacción con ambos tipos de receptores de la molécula de PA.

Esta interpretación se halla de acuerdo con la descripción de la reacción de coprecipitación de IgG de conejo o de fragmentos Fc γ con PA, inicialmente caracterizada utilizando anticuerpos F(ab') $_2$ anti-PA (Kronvall y Williams, 1971), que, al parecer, no deben interferir la interacción de Fc γ y PA, así como del hecho de que la modificación química selectiva de aminoácidos de la PA, como Tyr o Hys, que participan en el contacto con la región Fc γ (Deisenhofer y col., 1978), y de la que resulta una sensible disminución en su reactividad con diversas IgG, apenas afectan su actividad antigénica (Sjoholm y col., 1972; Sjoholm y col., 1973; Sjoholm y Sjodin, 1974) y, en definitiva, está de acuerdo con la existencia de dos tipos de receptores distintos en la molécula de PA, uno que uniría IgG por su región Fc γ y otro que la uniría por su región F(ab') $_2\gamma$, a través del que además une IgM e IgE. No obstante, y como se podía apreciar en los experimentos de inhibición competitiva, las estructuras que definen estos receptores, o se hallan próximas en la molécula de PA o, en todo caso, no deben ser completamente independientes, como sugiere la afectación generalizada de la capacidad de unión de Fc γ y F(ab') $_2\gamma$ tras la proteólisis de los estafilococos.

III.3. RECEPTOR DE PROTEINA A DE UNA IgM MONOCLONAL HUMANA

Los trabajos dirigidos al conocimiento de la región de la molécula de IgM implicada en la interacción con la PA se han efectuado con una proteína monoclonal, por la simpli-

ficación que puede suponerse de su naturaleza homogénea. Asimismo, la disponibilidad de grandes cantidades de esta IgM ha facilitado la preparación, por digestión enzimática controlada, de fragmentos de su molécula, cuya reactividad se ha estudiado por cromatografía de afinidad y en ensayos de inhibición competitiva de la interacción con PA de la IgM intacta. Los resultados obtenidos se extienden, más adelante, al conjunto de moléculas IgM policlonales del suero normal (III.4.1. y III.4.2.).

III.3.1. IgM Iz.

Se aisló del paciente Iz, con macroglobulinemia de Waldestrom, que tiene grandes cantidades de esta IgM en suero, 30-80 mg/ml, dependiendo del momento de su tratamiento, a partir del fluido obtenido del mismo por plasmaféresis.

Esta paraproteína es una euglobulina, lo que permite su aislamiento por precipitación repetida en soluciones de baja fuerza iónica (II.1.2.5.). La proteína así obtenida aparece como IgM antigénicamente pura en la inmunoelectroforesis de la figura II.7., con la movilidad restringida propia de su naturaleza monoclonal, y tras electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS y DTT, figura III.25., da dos bandas que migran en posiciones correspondientes a las de cadenas μ y cadenas ligeras. Su forma estructural es la pentamérica típica, como puede deducirse del patrón cromato-

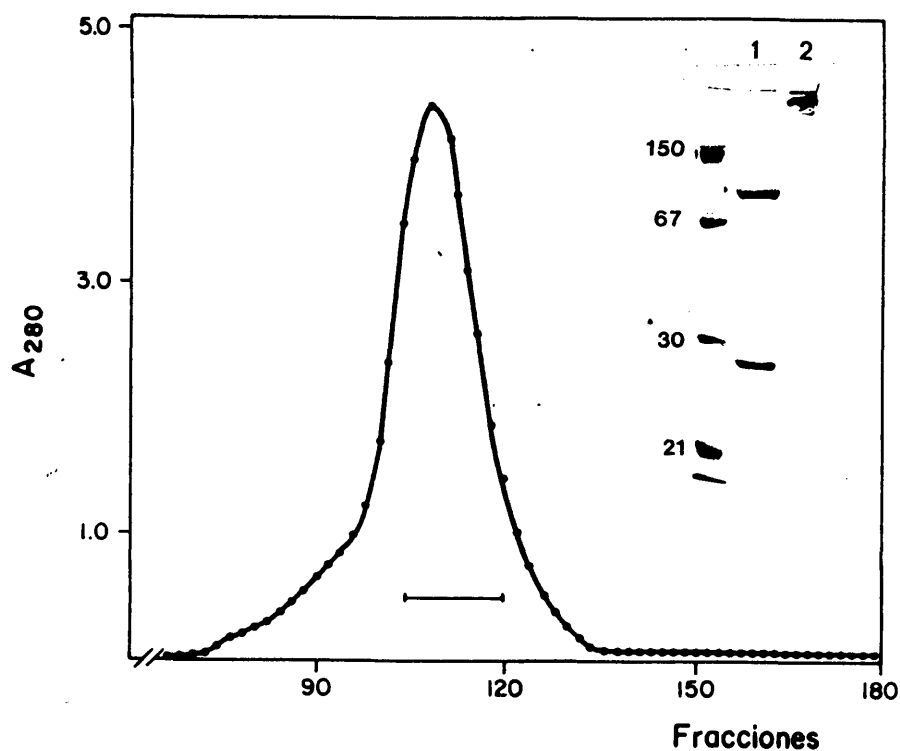


Figura III.25. Caracterización de la IgM Iz. Cromatografía de la IgM obtenida por euprecipitación del suero Iz en una columna de Sepharose 6B, 2.2×102 cm, eluida con PBSA a 15 ml/h. Las fracciones son de 1.5 ml y se han señalado las que se recogen para tener una preparación de IgM sin agregados de alto peso molecular. Las fracciones del volumen excluido y de elución de IgG como en la figura III.3.. Se muestra también el análisis por SDS-PAGE de esta IgM, reducida (1) y sin reducir, en un gel de 3.5%C, con 4%T en su zona superior y 9%T en la inferior. Se indica el $M_r(\times 10^{-3})$ de los marcadores de peso molecular utilizados.

gráfico obtenido en una columna de Sepharose 6B, figura III-25, así como de su reducida movilidad electroforética, cuando no está reducida, en la misma figura, de acuerdo con el gran tamaño molecular esperado para esta proteína.

La cadena ligera fue identificada de tipo λ por doble inmunodifusión con antisueros anti-cadenas λ y κ .

III.3.1.1. Cromatografía de IgM Iz en PA-Sepharose.

La mayoría de la IgM Iz, un 85%, es retenida en una columna de PA-Sepharose cuando la cromatografía se efectúa en condiciones no saturantes, tal como puede observarse en la figura III.29A., que muestra el perfil correspondiente a la cromatografía de 5 mg de IgM Iz en una columna capaz de unir 20 mg de IgM. Este comportamiento se contempla también con otras proteínas monoclonales reactivas con PA, que al ser cromatografiadas en esa columna de afinidad se reparten en sendas fracciones unida y no unida a la columna, cuya magnitud relativa es variable para cada proteína considerada (Grosv, 1975a; Biewenga y col., 1982).

En la figura III.26. se muestra el patrón cromatográfico obtenido en la elución de la IgM Iz de la columna de PA-Sepharose utilizando los mismos tampones de acidez creciente que se emplearon en el fraccionamiento de la IgM policlonal reactiva con PA (figura III.4.). Puede observarse una distribución fundamentalmente homogénea de la proteína

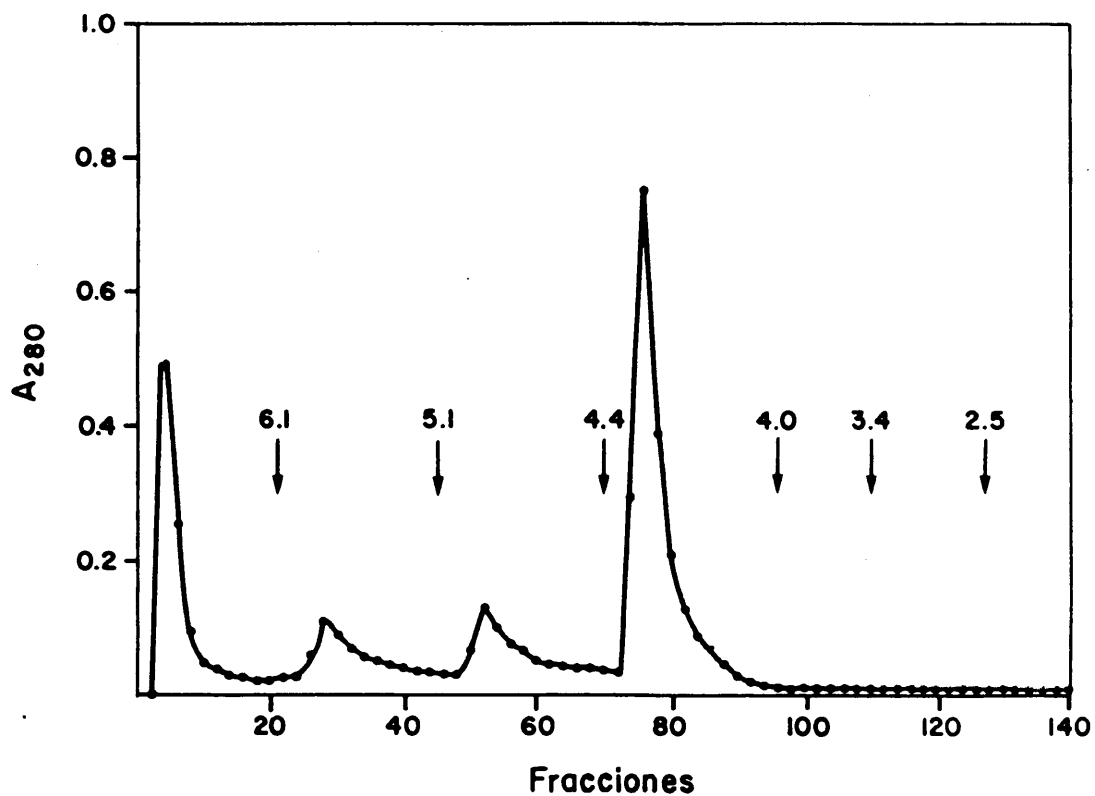


Figura III.26. Elución de IgM Iz de PA-Sepharose en función del pH. Cromatografía de 18 mg de IgM Iz en una columna de PA-Sepharose, 2 x 3.3 cm, equilibrada en PBSA. La elución de la proteína unida se hace con los tampones de acidez creciente de la tabla II.2., a 70 ml/h, en fracciones de 1.7 ml. Los distintos pH se muestran junto a las flechas que señalan el cambio de tampón de elución.

unida en un pico principal, con cantidades menores en otros dos. Otra diferencia respecto del cromatograma de las proteínas IgM de suero normal es su completa elución a pH 4.4, tampón con el que aún queda en la columna el 80% de la IgM policlonal (III.1.1.3.).

El no fraccionamiento y característica elución de la proteína Iz en esta columna, probablemente se deba a la individualidad de la IgM considerada, frente al conjunto heterogéneo de proteínas que son las IgM de suero normal.

III.3.2. Fragmentos Fab μ y (Fc) $_5\mu$.

En un primer intento para establecer a través de qué región de la molécula de IgM se produce su interacción con la PA, se prepararon los fragmentos Fab μ y (Fc) $_5\mu$, obtenidos tratando la IgM con tripsina en las condiciones de elevada temperatura necesarias para el mantenimiento de la integridad de los dominios C μ 3 y C μ 4, que a temperaturas inferiores son hidrolizados a pequeños péptidos (Plaut y Tomassi, 1970; Miller y Metzger, 1966).

La mayoría de la IgM resulta así digerida, separándose los productos obtenidos en dos picos tras filtración en una columna de Sephacryl S-300, figura III.27., que contienen los polipéptidos correspondientes a los fragmentos (Fc) $_5\mu$ (una banda de 40000 de Fc μ) y Fab μ (dos bandas, de 30000 y 25000, Fd μ y cadena ligera, respectivamente), como se obser-

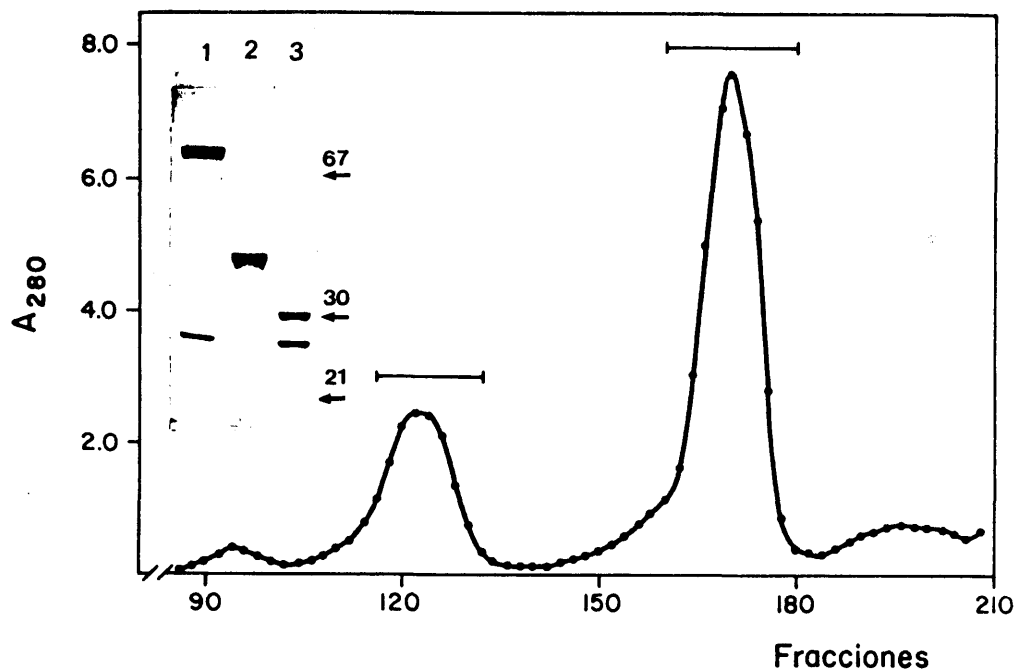


Figura III.27. Obtención de los fragmentos $(Fc)_5\mu$ y $Fab\mu$.

El cromatograma corresponde a la separación de los productos de digestión triptica de la IgM Iz en caliente (II.2.2.1.), en una columna de Sephacryl S-300 eluida a 40 ml/h con TA. Las fracciones son de 3.8 ml y se han señalado las que se reúnen conteniendo $(Fc)_5\mu$, primer pico, y $Fab\mu$, segundo pico, respectivamente. Se muestra también el análisis por SDS-PAGE en un gel de 3.5%C y 10%T de IgM Iz (1), $(Fc)_5\mu$ (2) y $Fab\mu$ (3), reducidos. Sobre las flechas los $M_r \times 10^{-3}$ de los marcadores de peso molecular.

va en el gel de poliacrilamida de la misma figura. Por otro lado, la inmunolectroforesis de la figura III.28. muestra cómo el $(Fc)_5\mu$, con movilidad anódica, carece de determinantes antigénicos de cadena ligera, que sólo se encuentran en el fragmento $Fab\mu$ del siguiente pico del cromatograma, el cual presenta un leve desplazamiento catódico, de acuerdo con la nula movilidad de la IgM entera. Esta ausencia de determinantes comunes entre el material de ambos picos se observa también en la inmunodifusión de la figura III.36, con un antisuero contra la IgM Iz.

El tiempo de digestión empleado, resulta de pruebas previas para la obtención de un fragmento $(Fc)_5\mu$ que no reaccione en inmunodifusión con sueros anti-cadenas ligeras, o que en los geles de poliacrilamida aparezca libre de cadenas pesadas, causa quizá del bajo rendimiento de su preparación, un 30% del máximo teórico.

III.3.2.1. Cromatografía de $(Fc)_5\mu$ y $Fab\mu$ en PA-Sepharose.

Cuando los fragmentos $(Fc)_5\mu$ y $Fab\mu$ se cromatografían en PA-Sepharose, eluyen en las fracciones correspondientes al material no retenido en la columna, figura III.29., mientras que la IgM del control de digestión, tratada en todo igual, excepto en la presencia del enzima proteolítico, conserva toda su reactividad. Así, el resultado obtenido con el fragmento $(Fc)_5\mu$ Iz discrepa del descrito para el $(Fc)_5\mu$

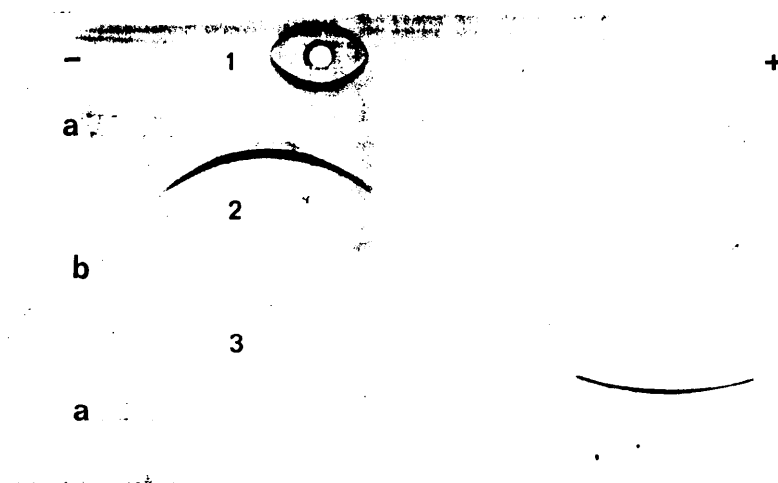


Figura III.28. Análisis de Fab_μ y $(\text{Fc})_{5\mu}$ por inmunoelectroforesis. El pocillo 1 contiene IgM Iz y el 2 y 3, material de los picos señalados en el cromatograma de la figura III.27. correspondientes a Fab_μ y $(\text{Fc})_{5\mu}$, respectivamente. Los antisueros son anti- IgM(H+L) , a, y anti-cadenas λ , b.

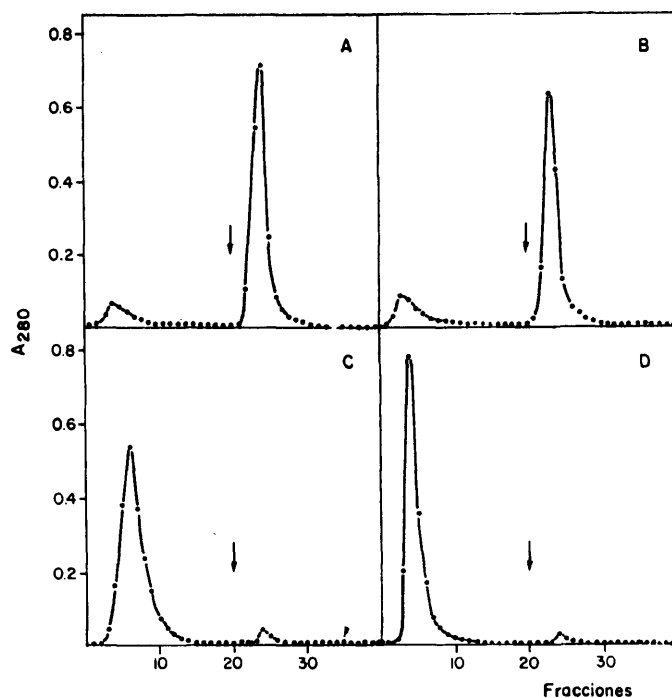


Figura III.29. Cromatografía de afinidad en PA-Sepharose de fragmentos trípticos de IgM. 5 mg de IgM (A), de Fab μ (C), de (Fc) μ (D) y de IgM control de digestión (B), se cromatografían en una columna de PA-Sepharose, 2 x 3.3 cm, equilibrada en TA. Las flechas señalan el inicio de la elución con Gly-HCl 0.1M, pH 2.5. Las fracciones son de 2.7 ml y el flujo de 80 ml/h.

aislado de modo similar de la proteína monoclonal As, que sí es retenido en la columna de PA-Sepharose (Grosv, 1975a).

III.3.3. Precusores de $(Fc)_5\mu$ en la proteólisis de IgM.

Para saber en qué momento del proceso de proteólisis de la IgM Iz se pierde la estructura reactiva con PA, se efectuaron digestiones durante tiempos más cortos que el empleado en la preparación del fragmento $(Fc)_5\mu$.

La figura III.30. muestra los perfiles cromatográficos de la filtración en una columna de Sephacryl S-300 de los digeridos de IgM correspondientes a 20, 30 y 50 minutos. Puede notarse la presencia de IgM no digerida que, no obstante, con sólo 20 minutos de proteólisis representa ya una muy pequeña fracción de la inicial. Con el aumento del tiempo de digestión, el primero de los dos picos principales, correspondiente al fragmento $(Fc)_5\mu$, disminuye y se desplaza levemente a posiciones de elución de material de menor peso molecular, en tanto que el segundo pico, con el fragmento $Fab\mu$, crece con la extensión de la proteólisis.

El contenido de las fracciones del pico correspondiente a la región $(Fc)_5\mu$, analizado por electroforesis en agarosa, aparece como una mezcla heterogénea de componentes cuyas movilidades comprenden desde el punto de aplicación hasta la del propio fragmento $(Fc)_5\mu$, figura III.31., si bien todos ellos antigénicamente relacionados, como indica la fu-

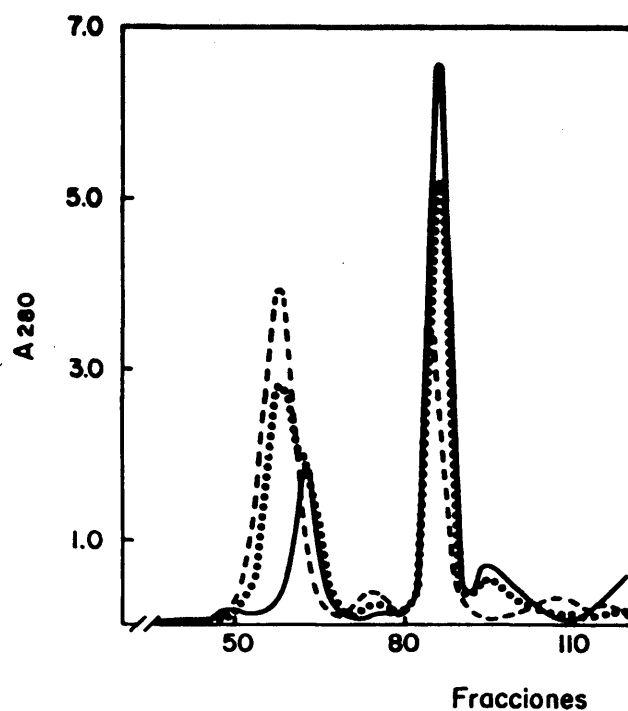


Figura III.30. Comparación de los productos de digestión trípica de IgM en caliente durante distintos tiempos, por cromatografía en una columna de Sephacryl S-300. La columna es de 2 x 141 cm, y se eluye con TA a 20 ml/h. Los perfiles corresponden a la digestión de 20 (---), 30 (.....) y 50 (—) minutos. Las fracciones son de 3.4 ml.

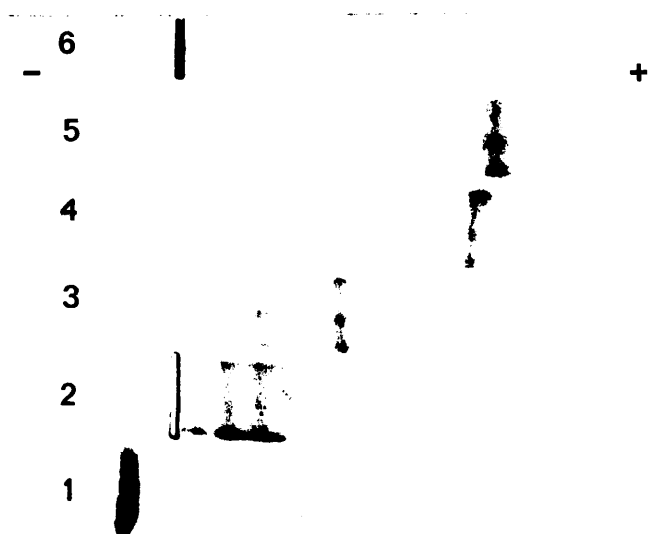


Figura III.31. Análisis de los productos de digestión trípica en caliente de IgM durante distintos tiempos, por electroforesis en agarosa.(II.5.1.). En cada pocillo se han puesto 25 μ g de IgM (6), y de los digeridos de 20 (2), 30 (3) y 50 (4) minutos. Además, Fab μ (1) y (Fc) μ (5), como referencia.

sión de las líneas de precipitación en la inmunoelectroforesis de la figura III.32A. y con determinantes de cadenas ligeras. Tras electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y reducidos con DTT, figura III.32B., dan, además de las correspondientes al fragmento Fc_{μ} , bandas con movilidades similares a las de cadenas pesada y ligera de la IgM, más abundantes cuanto menor es el tiempo de digestión.

De estos resultados se puede deducir que el material del pico considerado está constituido por una mezcla de moléculas de IgM parcialmente digerida conteniendo cantidades variables de regiones Fab_{μ} , a las que debería su menor movilidad electroforética en geles de agarosa respecto de la del $(Fc)_{5\mu}$, así como la presencia de determinantes de cadenas ligeras y las cadenas pesadas intactas observadas en los geles de poliacrilamida. Se trataría de especies precursoras del fragmento $(Fc)_{5\mu}$, cuyo contenido en Fab_{μ} se reduce conforme aumenta el tiempo de digestión. No obstante, estas especies no parecen representar todos los intermedios de digestión posibles, correspondientes a la presencia de 1,2,3,...,9 fragmentos Fab_{μ} de los 10 existentes en la IgM, reflejando, tal vez, el mecanismo de proteólisis que, como en inmunoglobulinas monoméricas, raramente produce subunidades digeridas en una de sus cadenas pesadas (Michaelson y Natvig, 1972), de modo que serían moléculas con un número de Fab_{μ} doble del de subunidades intactas.

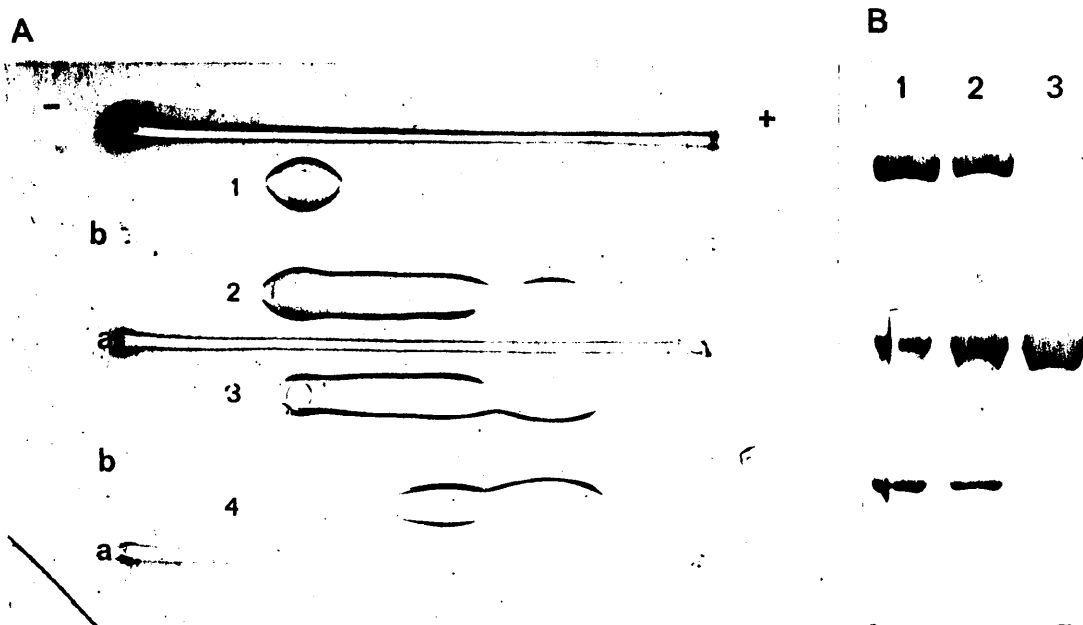


Figura III.32. Análisis de los productos de digestión trípica en caliente de la IgM durante distintos tiempos.

A, inmunolectroforesis de IgM (1) y de los digeridos de 20 (2), 30 (3) y 50 (4) minutos, con sueros anti-cadenas μ , a, y anti- $(Fc)_\mu$, b.

B, SDS-PAGE en un gel de 3.5%C y 10%T de los productos de digestión de IgM reducidos, correspondientes a 20 (1), 30 (2) y 50 (3) minutos de proteolisis.

III.3.3.1. Cromatografía de los precursores de $(Fc)_5^u$ en PA-Sepharose.

Estos productos de digestión incompleta son, a diferencia del fragmento $(Fc)_5^u$, parcialmente retenidos en la columna de PA-Sepharose y, como se indica en la figura III.33., la proporción relativa de las fracciones unida y no unida disminuye según procede la digestión, hecho que está de acuerdo con la incapacidad mostrada por el $(Fc)_5^u$ de esta proteína de fijarse a esta misma columna.

Para estudiar qué diferencias pueden presentar los componentes reactivo y no reactivo con PA-Sepharose de estas mezclas de intermedios de digestión de la IgM, se escogieron las correspondientes a uno de los tiempos de digestión.

Los patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones unida y no unida del digerido de 30 minutos son similares en composición polipeptídica, figura III.34A., pero la intensidad de las distintas bandas no es idéntica, ya que a la vez que las correspondientes a cadena pesada y ligera se hallan enriquecidas en la fracción retenida en la columna de PA-Sepharose respecto de la no unida, la de Fc_u es mucho menos aparente. Esto sugiere que, de la mezcla cromatografiada, aquellas moléculas con mayor número de cadenas pesadas intactas son las que resultan retenidas preferentemente en la columna de PA-Sepharose.

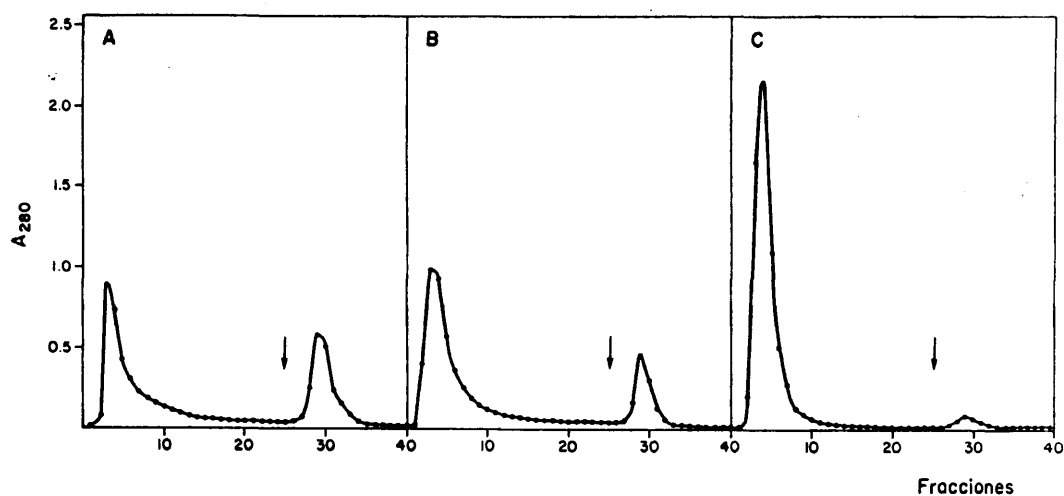


Figura III.33. Cromatografía de afinidad en PA-Sepharose de productos de digestión trípica en caliente de IgM durante distintos tiempos. En una columna de PA-Sepharose de 2 x 3.3 cm, equilibrada en TA, se cromatografian 5 mg de las mezclas de digestión de 20 (A), 30 (B) y 50 (C) minutos. Las flechas señalan el inicio de la elución con Gly-HCl 0.1M, pH 2.5. El flujo es de 80 ml/h, y las fracciones de 2.7 ml.

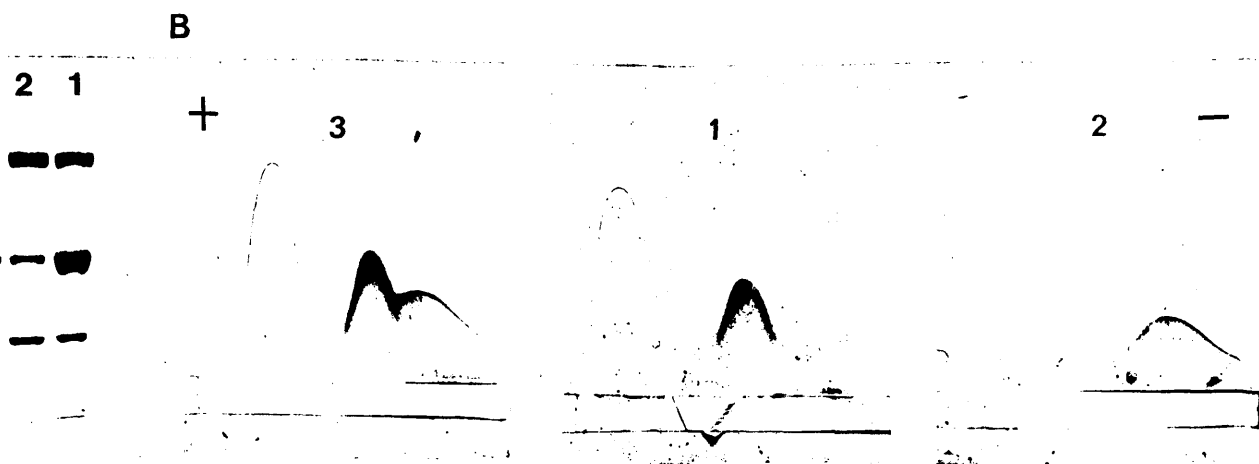


Figura III.34. Análisis de las fracciones unida (2) y no unida (1) a PA-Sepharose de la mezcla de digestión trípica en caliente de IgM durante 30 minutos (figura III.33.B.).
A, SDS-PAGE en un gel de 3.5%C y 10%T, reducidas.
B, inmunolectroforesis cruzada (II.5.1.2.) en agarosa conteniendo 3% suero anti-IgM (H+L), v/v, mostrando el material cromatografiado en 3.

Apoyan esta interpretación los resultados del análisis de las mismas fracciones por inmunolectroforesis cruzada con un suero anti-IgM. La figura III.34B. revela, de modo análogo a como aparecía en inmunolectroforesis, la heterogeneidad del producto cromatografiado. De este material, las moléculas más ácidas no son retenidas en la columna de PA-Sepharese, en tanto que la fracción unida está constituida por las moléculas con menor movilidad, debido a una mayor abundancia en regiones Fab μ , capaces de contrarrestar el desplazamiento anódico característico del fragmento (Fc) $_5\mu$.

III.3.4. Fragmentos F(ab') $_2\mu$.

Estos resultados sugieren que si bien la estructura a través de la que la IgM Iz interacciona con la PA no parece estar asociada a sus regiones Fab μ o (Fc) $_5\mu$ separadas, su reactividad se halla favorecida por el mantenimiento de subunidades intactas. Para averiguar qué papel pudieran desempeñar las regiones C $\mu 2$, que son destruidas en la digestión con pepsina (Plaut y Tomassi, 1970; Shimizu y col., 1974) pero se encuentran en los precursores de (Fc) $_5\mu$, se estudia el comportamiento cromatográfico de fragmentos F(ab') $_2\mu$.

Esta región se obtiene después de la digestión de la IgM Iz con pepsina (Kishimoto y col., 1968), recogién dose en las fracciones indicadas en el cromatograma de la figura III.35, correspondiente a la separación de los productos de

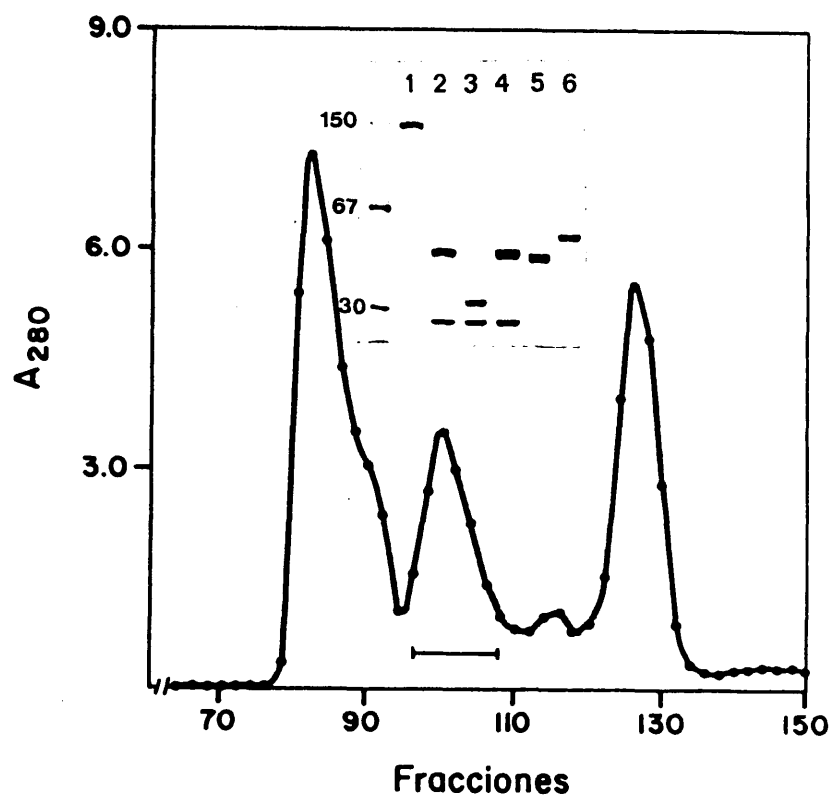


Figura III.35. Obtención del fragmento $F(ab')_2\mu$. El cromatograma muestra la separación de los productos de digestión de IgM con pepsina (II.2.2.2.) en una columna de Sephacryl S-200, 2.4×154 cm, eluida con PBSA. El flujo es de 40 ml/h y las fracciones de 2.5 ml. Se señalan las que se recogen con el fragmento $F(ab')_2\mu$. Se muestra también su análisis por SDS-PAGE, en los pocillos 1 y 2, reducido, de un gel de 3.5%C y 8%T, junto con el de $Fab'\mu$ (5 y reducido, 4) y el de $Fab\mu$ (6 y reducido, 3). Se indican los valores de M_r ($\times 10^{-3}$) de los marcadores de peso molecular utilizados.

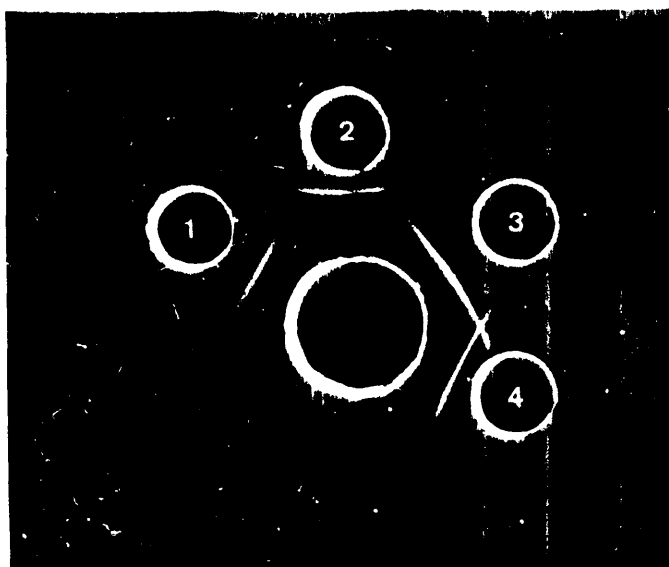


Figura III.36. Análisis antigénico de fragmentos de IgM.

Doble inmunodifusión de Fab μ (1), IgM (2), F(ab') $_2\mu$ (3)
y (Fc) $_5\mu$ (4) contra un suero anti-IgM (H+L).

proteolisis en una columna de Sephacryl S-200.

Su análisis por SDS-PAGE, reducido con DTT, muestra la composición polipeptídica esperada: una banda con la cadena ligera y otra con el segmento de cadena pesada que incluye el dominio $C\mu 2$, y por consiguiente de mayor tamaño que la del $Fab\mu$, figura III.35.. En la inmunodifusión de la figura III.36., con un antisuero contra la IgM Iz, puede apreciarse su carencia de determinantes antigénicos comunes al fragmento $(Fc)_5\mu$, así como su reacción de identidad parcial con la IgM.

III.3.4.1. Cromatografía de $F(ab')_2\mu$ en PA-Sepharose.

La mayoría del $F(ab')_2\mu$ cromatografiado en PA-Sepharose no es retenido en la columna de afinidad, figura III.39A., eluyéndose de la misma con el tampón ácido una pequeña cantidad del fragmento utilizado. Comparándolo con los cromatogramas análogos de los fragmentos $Fab\mu$ y $(Fc)_5\mu$, figura III.29., la principal diferencia observable es la forma del pico con el material no unido, que suele presentarse en los casos en que la proteína interacciona con el medio cromatográfico, aunque sin la afinidad suficiente para quedar retenida en él.

III.3.5. Subunidades de IgM.

El estudio de la interacción con PA-Sepharose

de las subunidades de IgM, esto es, de los monómeros μ_2L_2 , se efectuó entonces con el fin de conocer si la reactividad de la IgM precisa de áreas interdominio en torno al $C\mu 2$, como sucede en la IgG con sus regiones $C\gamma 2$ y $C\gamma 3$ (Lancet y col., 1978).

La preparación de estas subunidades requiere la reducción parcial de la molécula de IgM Iz, la cual muestra una susceptibilidad extrema a este tratamiento, ya que en las condiciones de reducción empleadas con otras proteínas IgM (Miller y Metzger, 1965), resultan afectados otros puentes disulfuro además de los intersubunidades. Por ello se probaron distintas cantidades de reductor, para optimizar el proceso de obtención de sus monómeros.

La figura III.37 muestra los perfiles cromatográficos de la filtración en una columna de Sepharcyl S-300 de la proteína Iz reducida con las concentraciones señaladas de DTT. Puede apreciarse cómo con el aumento de la cantidad de agente empleado se redistribuye la proteína en el eluido de la columna, hacia posiciones correspondientes al peso molecular de los monómeros de IgM, de modo que con 1mM DTT no queda prácticamente nada de IgM pentamérica.

El análisis de los segundos picos de estos cromatogramas mediante SDS-PAGE muestra, además de las correspondientes al monómero, bandas de movilidad mayor, figura III.37 .. Sin embargo, su proporción guarda relación con la cantidad de

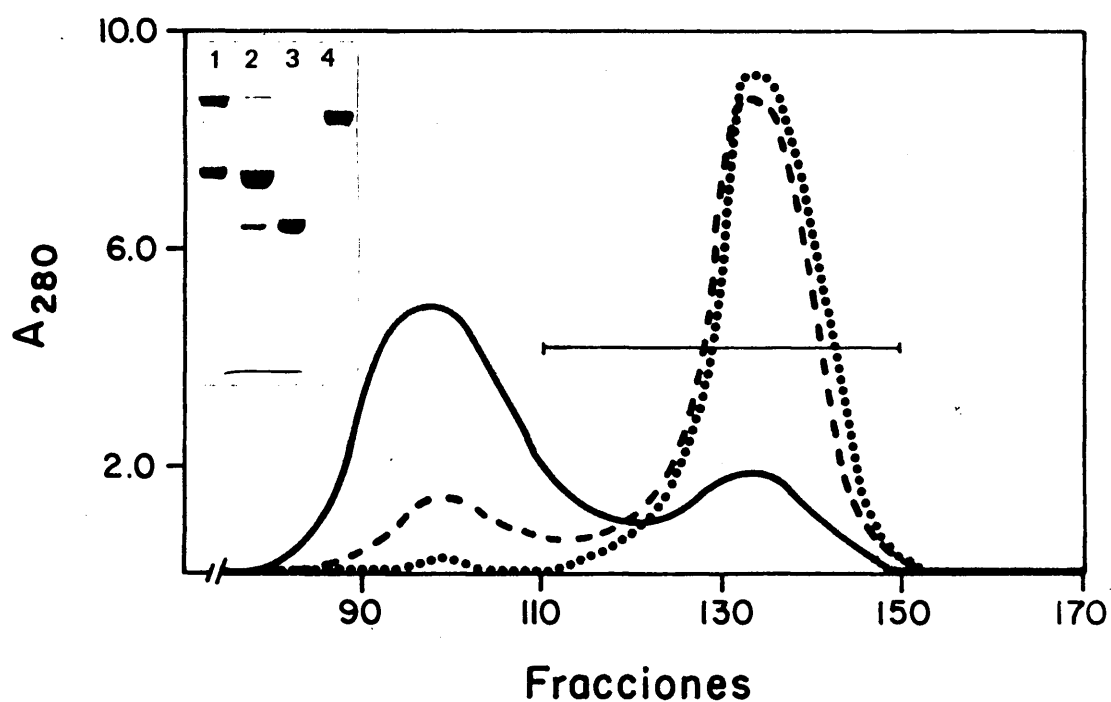


Figura III.37. Análisis de los productos de reducción parcial de IgM Iz con cantidades variables de DTT. Los perfiles cromatográficos corresponden a la elución de una columna de Sephacryl S-300, 3.5 x 98 cm, de la IgM reducida con DTT 1mM (---), DTT 0.4mM (- - -) y DTT 0.2mM (—) como se describe en II.2.2.7.. El flujo es de 50 ml/h y las fracciones de 3.8 ml, señalándose las recogidas, en la reducción con DTT 0.2mM, para la repurificación de la IgM monomérica. Se muestra también el análisis por SDS-PAGE, en un gel de 3.5%C y 7%T, de los segundos picos de los perfiles de elución cuando la IgM se reduce con DTT 0.2mM (1), DTT 0.4mM (2) y DTT 1mM (3); como referencia IgG policlonal (4).

DTT empleada, de modo que el mayor rendimiento en la banda de movilidad equivalente a 180000, se obtiene con 0.2mM DTT, por lo que a pesar de la baja eficiencia de reducción de la IgM, figura III.37 ., es la concentración de DTT escogida para la preparación de sus subunidades.

La figura III.38. muestra el perfil correspondiente a la cromatografía en una columna de Sephacryl S-200 de las fracciones de III.37 . conteniendo IgM monomérica tras reducción con 0.2mM DTT, para liberarla de todos los agregados y polipéptidos de tamaño distinto del de las subunidades de IgM. El material recogido está constituido, además de por subunidades con puentes disulfuro entre cadenas pesadas intactos, por dímeros no covalentes μL , como sugiere la electroforesis en gel de poliacrilamida de la figura III.37 ..

Situaciones similares se conocen en la preparación de subunidades de IgM policlonal y monoclonal de ratón (Parkhouse, 1975; Giles y col., 1983) y es posible que ocurra con carácter más general, debido a que los productos de reducción parcial no siempre son caracterizados en condiciones disociantes.

III.3.5.1. Cromatografía de IgM monomérica y Fab' μ en

PA-Sephárose.

Esta preparación de subunidades de IgM muestra, a diferencia de la IgM intacta, una baja afinidad por la colum-

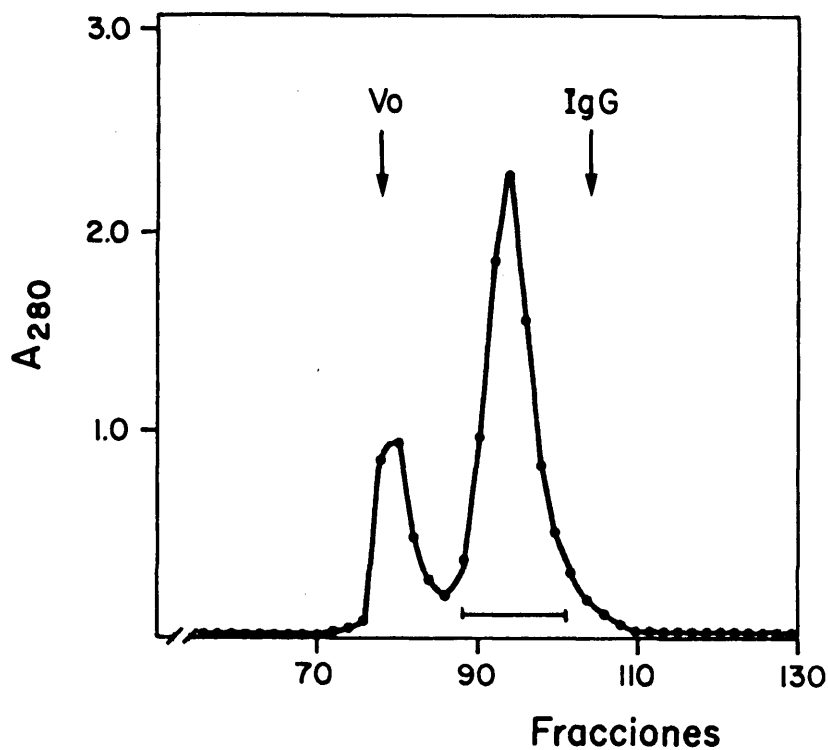


Figura III.38. Recromatografía de las fracciones señaladas en la figura III.37. de los productos de reducción de IgM con DTT 0,2mM. La columna es de Sephacryl S-200, 2.4 x 140 cm, eluida con PBSA a 30 ml/h cogiendo fracciones de 2.4 ml. Se han señalado las correspondientes al volumen excluido de la columna y las de elución de IgG, así como las recogidas conteniendo monómeros de IgM.

na de PA-Sepharose, reteniéndose en ella una pequeña parte del material cromatografiado, en tanto que lo que no se une eluye lentamente de la columna, figura III.39C., dando un patrón similar al obtenido con el fragmento $F(ab')_2^\mu$.

Una relación similar entre la reactividad con PA y el estado de polimerización ha sido descrito para otras proteínas IgM monoclonales y, por ejemplo, de las diversas especies intracelulares halladas en la línea linfoblastoide humana L173, productora de IgM, aquellas más organizadas en su proceso de ensamblaje hacia formas maduras pentaméricas son las que preferentemente se unen a células de *S. aureus* (Howell-Saxton y Wettstein, 1978). Asimismo, las subunidades de esta proteína, y las de la IgM Se (Harboe y Folling, 1974), muestran afinidades menores por los estafilococos que sus correspondientes formas pentaméricas, recuperándose esta capacidad de interacción en las moléculas pentaméricas producidas por reoxidación de esas subunidades (Harboe y Folling, 1974). La IgM As, cuyas subunidades sí se fijan a PA-Sepharose, aparecen, no obstante, como una excepción (Grov, 1975a).

Por otro lado, incluso la conversión del $F(ab')_2^\mu$ a su forma monomérica Fab'_{μ} , por reducción parcial, figura III.40A. afecta su comportamiento en la columna de PA-Sepharose, ya que además de no fijarse, su perfil cromatográfico, figura III.39B., es muy parecido al del fragmento Fab_{μ} , sin el retraso en la elución de la proteína no retenida observa-

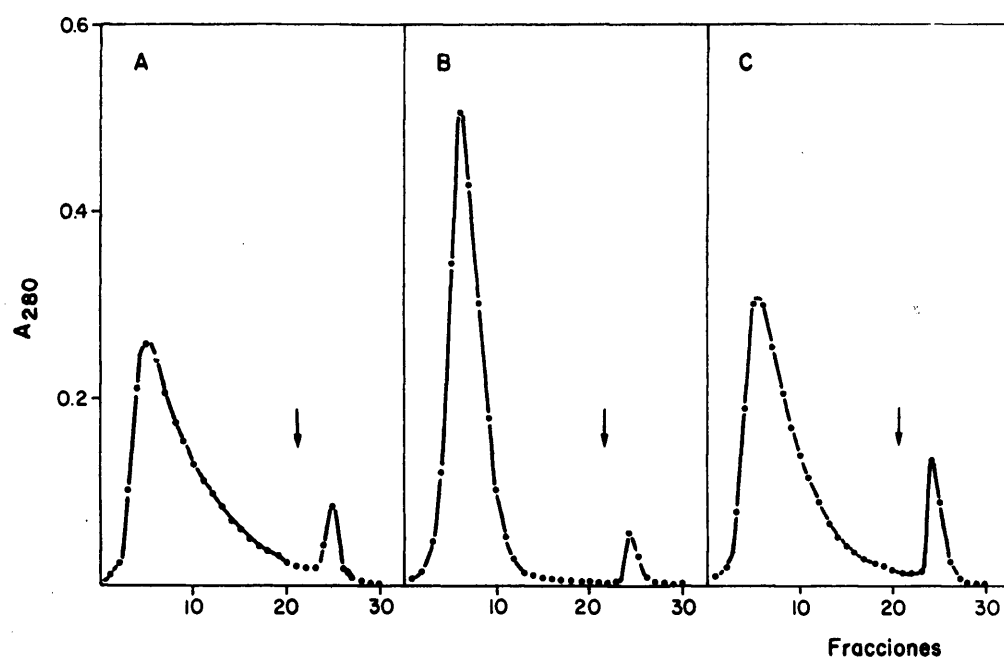


Figura III.39. Cromatografía en PA-Sepharose de fragmentos de IgM con el dominio Cu2. 5 mg de $F(ab')_2\mu$ (A), de $Fab'\mu$ (B) e IgM monomérica (C), se cromatografían en una columna de PA-Sepharose, 2 x 3.3 cm, equilibrada en PBSA. Las flechas señalan el inicio de la elución con Gly-HCl 0.1M, pH 2.5. Las fracciones son de 2.7 ml y el flujo de 80 ml/h.

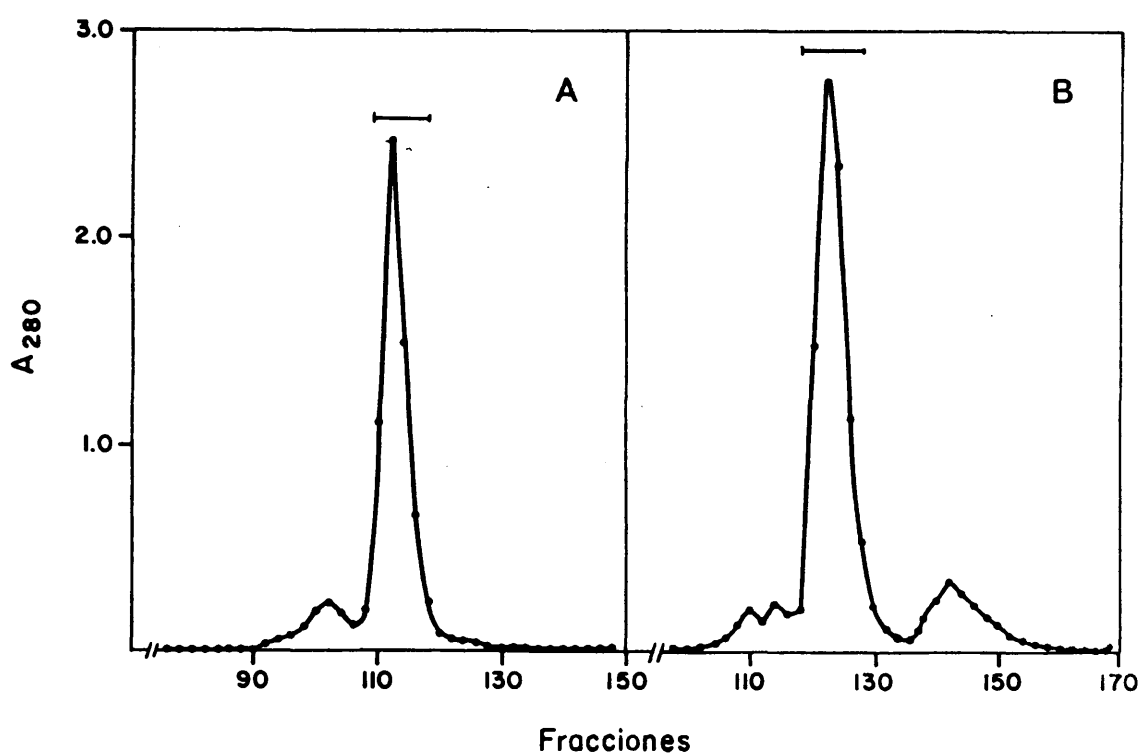


Figura III.40. Preparación de los fragmentos Fab' μ y Fc μ .

Cromatogramas correspondientes a la cromatografía en una columna de Sephacryl S-200, 2 x 150 cm, equilibrada en PBSA, de los productos de reducción parcial de F(ab')₂ μ (A) y (Fc)₅ μ (B) (II.2.2.3-4.). Las fracciones son de 2.5 ml y el flujo de 25 ml/h. Se indican las fracciones recogidas conteniendo Fab' μ y Fc μ .

do en los correspondientes a IgM monomérica y $F(ab')_2\mu$ (figura III.39.).

De este modo, ni la presencia del dominio $C\mu 2$ en $F(ab')_2\mu$ o en IgM monomérica, ni el mantenimiento, también en las subunidades de IgM, de estructuras interdominio, parcialmente ausentes en los otros fragmentos, determinan una eficaz interacción con la PA en la columna de afinidad, y de las otras preparaciones estudiadas que no sean la IgM intacta, solamente aquellas procedentes de digestiones incompletas de la proteína con tripsina, consistentes en moléculas con algunas de sus regiones $Fab\mu$, son capaces de ser retenidas en PA-Sepharose, e incluso de ellas las menos digeridas.

Así, si la presencia de la región $(Fc)_3\mu$, común a todos los intermedios de digestión triptica, no parece crítica para su retención en la columna de PA-Sepharose, sino más bien el mayor número de cadenas pesadas intactas y, en todo caso, sólo las subunidades de IgM o los fragmentos $F(ab')_2\mu$, asimismo sin la porción $Fc\mu$, son las otras fracciones de la molécula que muestran una cierta reactividad con la columna, puede pensarse que el receptor de PA ha de estar asociado a la región $Fab\mu$ o a estructuras determinadas por varias de ellas, pues aunque el fragmento $Fab\mu$ aislado no se une a la columna, los intermedios de digestión triptica de menor contenido en $Fab\mu$, que tampoco son retenidos en PA-Sepharose, interaccionan débilmente, retrasándose en su

elución, figura III.33., sugiriendo que la estructura buscada puede estar definida, probablemente, por un número mínimo de regiones Fab μ y/o su suficiente proximidad en la molécula reactiva con PA-Sepharose.

III.3.6. Inhibición competitiva de la fijación de IgM-{I¹²⁵} a proteína A.

Puesto que los experimentos de cromatografía de afinidad con los distintos fragmentos de la IgM Iz se revelan incapaces de resolver el problema planteado, se recurrió al estudio de la inhibición competitiva de la fijación de la IgM Iz radiactiva a PA por los distintos fragmentos de su molécula que se han venido considerando. Estos ensayos permiten contemplar cuantitativamente interacciones que, como las mediadas por mecanismos de baja avidéz, en PA-Sepharose aparecen asociadas a formas de reactividad representadas por la no fijación a la columna o la elución retrasada de ella.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura III.41., observándose, efectivamente, reactividad en las regiones Fab μ , si bien su actividad inhibidora se manifiesta a concentraciones mayores que las de otros fragmentos, para un efecto equivalente en la interferencia de la fijación de la IgM a la PA. Puede verse que la IgM monomérica y el F(ab')₂ μ inhiben también completamente, con similar eficiencia, esa interacción, pero su afinidad, aunque mayor que la de Fab μ

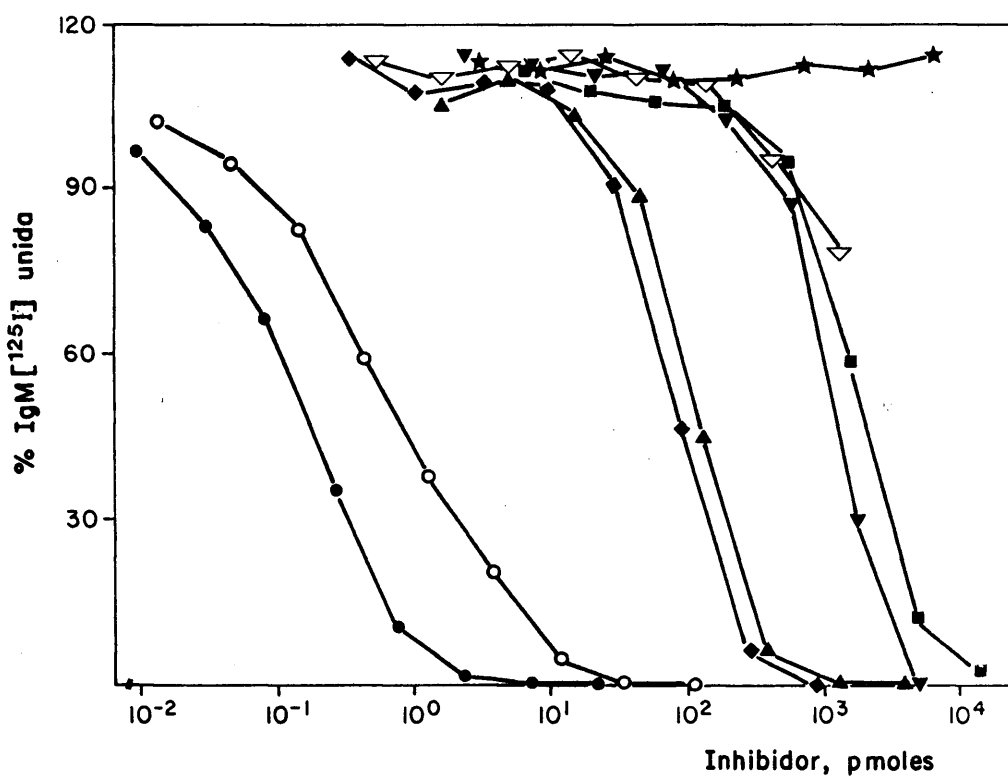


Figura III.41. Inhibición competitiva de la fijación de IgM Iz a proteína A. 10-20 ng de IgM-Iz $\{^{125}\text{I}\}$, 40000 cpm, se mezclan con soluciones de concentración variable de IgM policlona (●), IgM Iz (○), subunidades de IgM (◆), F(ab')_2 (▲), Fc_5 (∇), Fc (★), Fab' (▼) y Fab (■), en un volumen final de 55 μl , e inmediatamente 50 μl se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 μl de PA, 1 $\mu\text{g/ml}$. La fracción de IgM-Iz $\{^{125}\text{I}\}$ unida se calcula a partir de la radiactividad fijada después de 1.5 horas, como se indica en II.9.2..

es menor que la de la molécula de IgM intacta.

Así, como se muestra en la tabla III.4., la capacidad inhibidora de $F(ab')_2\mu$ y de la IgM monomérica es unas 140 veces menor que la de la IgM pentamérica, y la de los fragmentos $Fab'\mu$ o $Fab\mu$, aproximadamente unas 2200 veces menor. Estos resultados se hallan de acuerdo con la información proporcionada por los cromatogramas de PA-Sepharose, de modo que a la mayor avidez de la IgM en este ensayo corresponde su retención en la columna y a interacciones progresivamente más débiles, como son las de IgM monomérica y $F(ab')_2\mu$ o $Fab\mu$, un retraso en su elución o la no fijación sin más, respectivamente.

Según el valor de K_a , 7.5×10^7 l/mol, calculado de los resultados de la figura III.41. (II.9.2.), la avidez de la IgM Iz por la PA es algo menor que la de la IgM policlonal calculada en un ensayo similar (III.4.4.) o en los experimentos de fijación a *S. aureus* (III.1.2.2.), lo cual se halla de acuerdo con la mayor actividad inhibidora de la fijación de IgM-Iz- $\{^{125}I\}$ observada para la IgM policlonal (tabla III.4.). Esta diferencia de afinidad, asimismo, tal vez guarde relación con que la proteína monoclonal resulte eluida de la columna de PA-Sepharose a pH 4.4, mientras que en condiciones similares permanece retenida gran parte de la IgM policlonal (figura III.4.).

La débil acción inhibidora que presenta el fragmen-

Tabla III.4. REACTIVIDAD DE FRAGMENTOS DE IgM
CON PROTEINA A

Inhibidor	Concentración que da 50% inhibición	Actividad inhibidora
IgM Iz	1.3×10^{-8}	1
IgM policlonal	3.0×10^{-9}	4.4
F(ab') ₂ $_{\mu}$	2.2×10^{-6}	6.0×10^{-3}
Fab' $_{\mu}$	2.4×10^{-5}	5.5×10^{-4}
Fab $_{\mu}$	3.5×10^{-5}	3.8×10^{-4}
IgM monómero	1.6×10^{-6}	8.3×10^{-3}
(Fc) ₅ $_{\mu}$	$>> 2.5 \times 10^{-5}$	-
Fc $_{\mu}$	$>> 1.3 \times 10^{-4}$	-
Fv	5.8×10^{-5}	2.3×10^{-4}
V _H	1.6×10^{-5}	8.3×10^{-4}
V _L	$>> 3.7 \times 10^{-4}$	-
L Iz	$>> 9.3 \times 10^{-4}$	-

Se muestra la reactividad de distintos fragmentos de IgM en la inhibición competitiva de la fijación de IgM(Iz)- $\{^{125}\text{I}\}$ a pocillos de PVC con PA (II.9.2., figura III.41.). La actividad inhibidora está referida a la de la IgM Iz. En la columna de concentración de inhibidor que da el 50% de inhibición, para aquellos que no la producen, indicados con actividad -, se señalan las máximas concentraciones ensayadas. La tabla se ha realizado con los datos de las figuras III.41. y III.51..

to $(Fc)_5\mu$ puede atribuirse a la presencia de una muy pequeña cantidad de $Fab\mu$, detectada en su reactividad con anticuerpos específicos contra cadenas λ , figura III.42., ya que, por otro lado, el fragmento $Fc\mu$ aislado de cualquier subunidad intacta residual, por filtración de los productos de la reducción parcial de esta preparación de $(Fc)_5\mu$, figura III.40B., carece completamente de actividad inhibidora, figura III.41.

Así, teniendo en cuenta el efecto de la despolimerización de la IgM sobre su capacidad de interacción con PA y la baja afinidad intrínseca de los sitios de unión de sus regiones $Fab\mu$, se hace aparente el destacado efecto que, como en otros sistemas de interacción multivalentes (Karush, 1978; Sarkart y col., 1979) tiene la presencia repetida de receptores de PA en la molécula intacta de IgM, a la que debe la mayor avidez mostrada en su reactividad con la PA respecto de formas de IgM monoméricas (tabla III.4.).

III.3.7. Subfragmentos de la región $Fab\mu$.

Para definir más precisamente la situación del receptor de PA en el fragmento $Fab\mu$ de la IgM Iz se consideran, a continuación, las reactividades de varios polipéptidos constituyentes del mismo, como son su cadena ligera y los dominios variables, aislados o formando parte del fragmento Fv , para compararlas con la conocida de la región $Fab\mu$ y así tratar de establecer si puede asociarse a alguno de ellos las estruc-

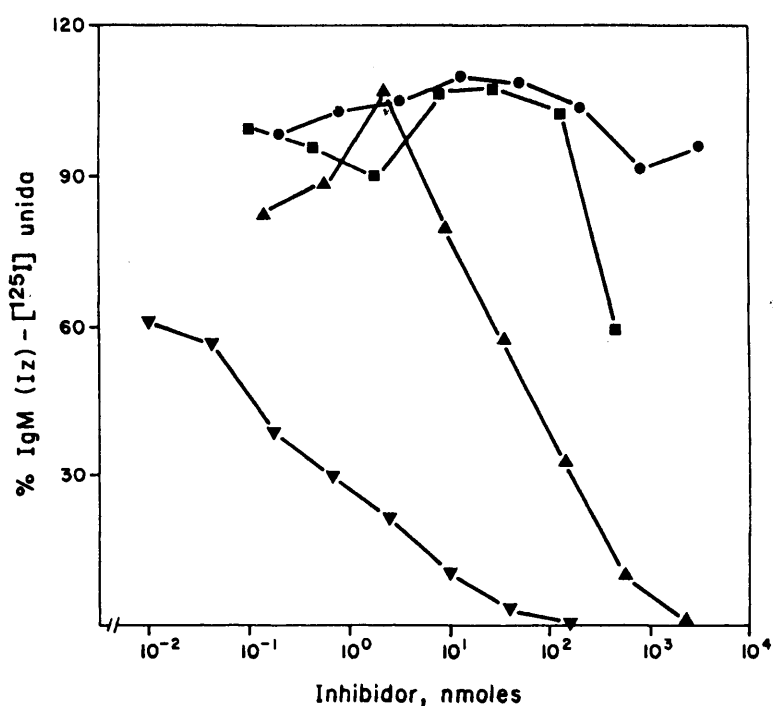


Figura III.42. Determinantes de cadenas ligeras en fragmentos de IgM. 20 ng de IgM{¹²⁵I} , 40000 cpm, se mezclan con soluciones de concentración variable de IgM Iz (▼), Fab μ (▲), (Fc) μ (■) y Fc μ (●), en un volumen final de 60 μ l. Inmediatamente, 50 μ l de estas mezclas se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 μ l de IgG monoclonal de ratón anti-cadenas λ humanas (HG3/6.1, regalo del Dr. Sánchez Madrid), 8 μ g/ml, y la fracción de IgM-Iz{¹²⁵I} unida se calcula a partir de la radiactividad fijada tras 1 hora, según II.8.2..

turas que determinan el sitio de interacción con la PA.

III.3.7.1. Obtención del fragmento Fv.

Este fragmento se prepara por digestión de la IgM intacta con pepsina, a baja temperatura (Lin y Putnam, 1978). La figura III.43. muestra el análisis por SDS-PAGE del fraccionamiento de la mezcla de digestión en una columna de Sephacryl S-200, del que se recogen las fracciones del pico principal del cromatograma de la figura III.43., constituidas por polipéptidos con movilidades correspondientes a un peso molecular en torno a 15000.

A la vista de los productos formados en la digestión con pepsina, tal como se advierte en el cromatograma de la figura III.43., la IgM Iz parece seguir la vía de digestión de la IgM Cam (Lin y Putnam, 1978), en la que el fragmento Fv se obtiene directamente, con alto rendimiento, a partir de la hidrólisis en puntos entre los dominios variable y constante de las cadenas μ y L.

En la inmunodifusión con un antisuero contra la IgM Iz, este material presenta identidad parcial, con deficiencia de determinantes antigénicos, con el fragmento Fab μ , como puede observarse en la figura III.44. y, asimismo, lleva determinantes de cadena ligera, de acuerdo con lo que había de esperarse para la región Fv de la IgM.

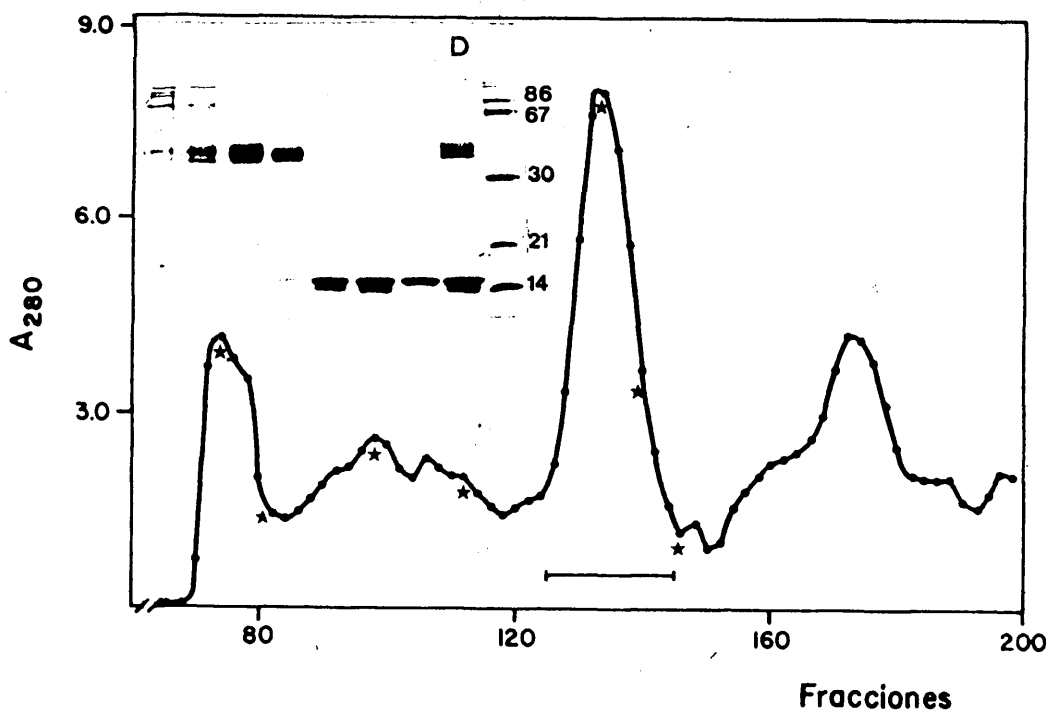


Figura III.43. Obtención del fragmento Fv. El cromatograma muestra la separación de los productos de digestión de IgM Iz con pepsina en frío (II.2.2.5.) en una columna de Sephacryl S-200, 3 x 146 cm, eluida con PBSA a 40 ml/h. Las fracciones son de 4.2 ml. Se muestra asimismo el análisis por SDS-PAGE, en un gel de 5.3%C y 12%T, de las fracciones señaladas, en su orden de elución de izquierda a derecha, (*), indicándose las recogidas conteniendo el fragmento Fv. En el electroforetograma, D es la mezcla de digestión y los números el M_r ($\times 10^{-3}$) de los marcadores de peso molecular utilizados.

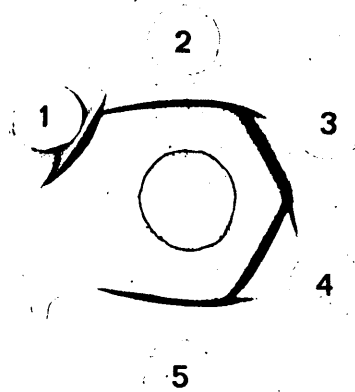


Figura III.44. Análisis antigénico del fragmento Fv.

Doble inmunodifusión en agarosa con 3% PEG 6000, p/v, de IgM Iz (1), Fabμ (2 y 5), Fv (3) y cadena ligera Iz (4), contra un suero anti-IgM Iz (H⁺L).

Sin embargo, cuando se analiza por electroforesis en agarosa, produce varias bandas, figura III.45., y esta aparente falta de homogeneidad determinó su repurificación en un intercambiador iónico.

La preparación de Fv obtenida de la columna de Sephacryl S-200 se resuelve en dos picos de muy distinto tamaño cuando se cromatografía en CM-celulosa, figura III.45., cuyo análisis por SDS-PAGE, figura III.46B., muestra que la banda mayoritaria del material de partida se encuentra en las fracciones eluidas de la columna por aumento de la fuerza iónica del tampón de elución, mientras que el componente minoritario se halla en las correspondientes a lo no retenido en la columna en las condiciones de carga. De acuerdo con este patrón cromatográfico, en electroforesis en agarosa el pico eluido de la columna con el gradiente de concentración de sal tiene movilidad catódica y el pico no unido a ella movilidad anódica, figura III.45.

El material de estos dos picos, estudiado por inmunodifusión con un antisuero contra la IgM Iz, figura III.46A., muestra su identidad antigénica parcial con el considerado como Fv, del que se han aislado, y entre ellos dan un curioso dibujo, con líneas de no identidad, pero también con una línea de identidad, aunque invertida, formada probablemente por la asociación de ambos componentes en esa zona del gel de agarosa, en un producto que por la fusión que muestran en sus extremos las correspondientes líneas de precipitación,

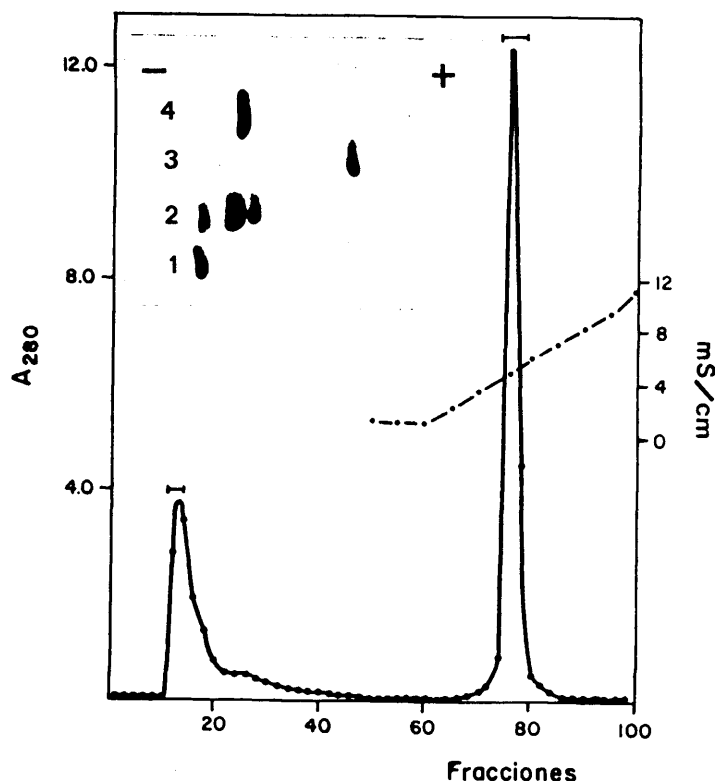


Figura III.45. Repurificación del fragmento Fv en CM-celulosa.

El cromatograma muestra la elución de Fv cromatografiado en una columna de CM-celulosa, 3 x 16 cm, equilibrada en fosfato sódico 0.01M, pH 7.2, y eluida a 150 ml/h en fracciones de 4.2 ml. (---) representa la conductividad específica de las fracciones cuando se eluye con un gradiente de concentración de sal, obtenido al mezclar 150 ml del tampón inicial y 150 ml del mismo tampón con NaCl 0.4M. En el cromatograma se muestran las fracciones recogidas como material inicialmente no unido (3) y unido (1) a la celulosa, mostrándose su análisis por electroforesis en agarosa junto con el del material cromatografiado (2) y Fabu (4), como referencia.

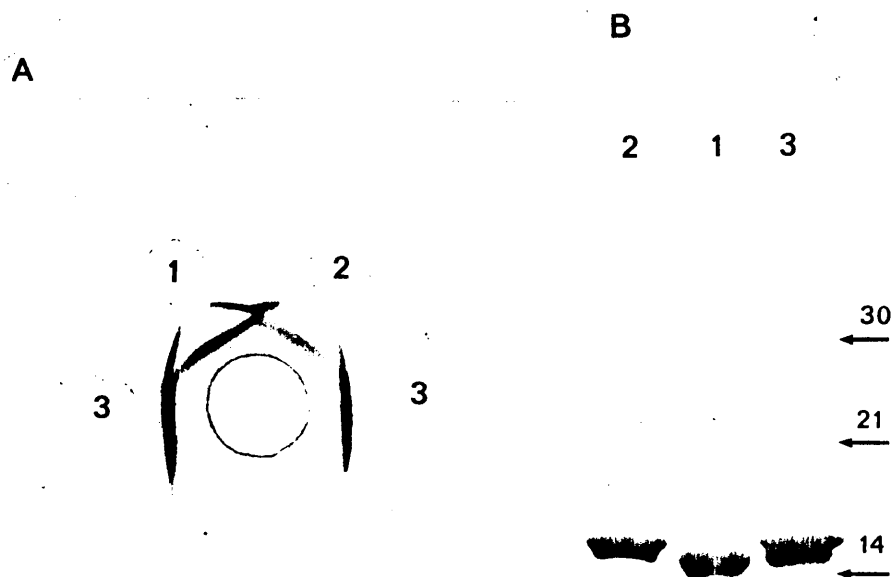


Figura III.46. Análisis de las fracciones de Fv no unida (1) y unida (2) a CM-celulosa.

A, doble inmunodifusión en agarosa con 3% PEG 6000, p/v, de 1, 2 y Fv (3) contra un suero anti-IgM Iz(H+L).

B, SDS-PAGE, en un gel de 5.3%C y 12%T, de 1, 2 y Fv, indicando los valores de M_r ($\times 10^{-3}$) de los marcadores de peso molecular utilizados.

debe ser análogo al Fv de los otros pocillos.

III.3.7.2. Obtención de los dominios V_H y V_L .

Si la fracción mayoritaria de la columna de CM-celulosa fuese el fragmento Fv, aunque sus dos polipéptidos constituyentes, V_H y V_L , no se resolviesen por electroforesis en poliacrilamida, como ocurre con los Fv de otras IgM de mieloma (Lin y Putnam, 1978), cabría esperar que una posible diferencia de carga entre ellos permitiese separarlos (Ben-Neriah y col., 1978). Sin embargo, cuando se recromatografía en la misma columna, pero en presencia de urea 6M, queda igualmente retenido y eluye en su totalidad, en un solo pico, figura III.47., cuando se aumenta la fuerza iónica del tampón de elución.

La aparente homogeneidad de esta fracción se manifiesta también cuando se analiza mediante isoelectroenfoque, figura III.47., al producir una única banda, cuyo pI es de difícil determinación debido a su extrema basicidad, lo que le sitúa en una zona del gradiente de pH con deriva catódica, pero que por referencia a las movilidades del citocromo c y del quimotripsinógeno, puede estimarse alrededor de 9.5-9.8.

Para una definitiva identificación de este material se hicieron los mapas peptídicos de las dos fracciones de CM-celulosa, comparándolos con los de polipéptidos conocidos

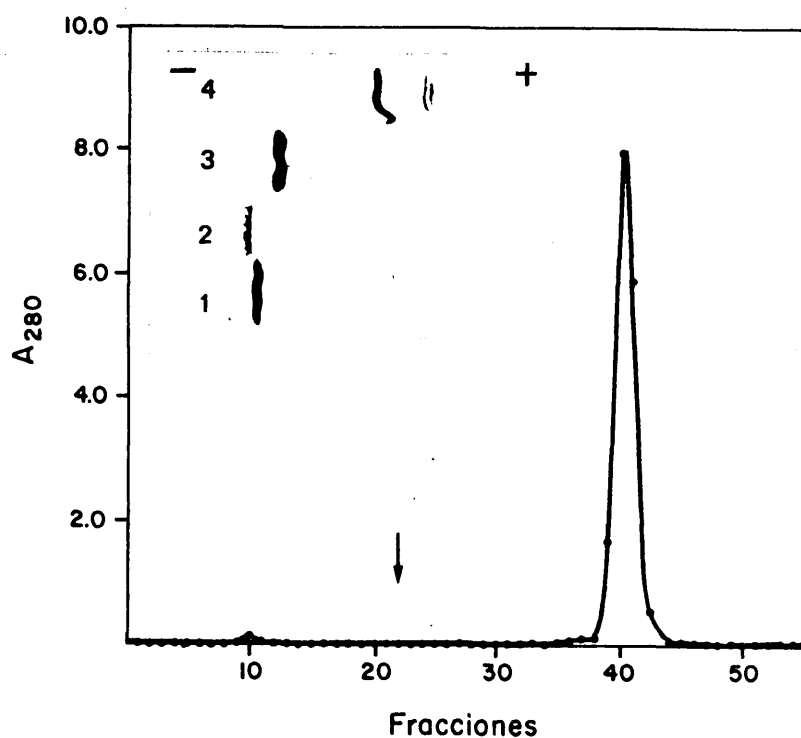


Figura III.47. Análisis de la fracción de Fv unida a CM-celulosa. El cromatograma corresponde a la cromatografía en una columna de CM-celulosa, 3 x 16 cm, equilibrada en fosfato sódico 0,01M, pH 7.2, urea 6M. El flujo es de 120 ml/h y las fracciones de 3.5 ml, indicando con la flecha el comienzo de la elución con un gradiente de concentración de sal como el de la figura III.45.. Se muestra asimismo su análisis por isoelectroenfoque en agarosa (II.5.9.), pH 3.5-10.0, en el pocillo 1. Como marcadores de pI, citocromo c (2), quimotripsinógeno A (3) y mioglobina (4).

como son el Fd y la cadena ligera del fragmento Fab_u.

La figura III.48. muestra los autorradiogramas de los mapas obtenidos con los péptidos formados en la digestión con tripsina de las bandas correspondientes a los dos picos, después de marcarlos radiactivamente con ^{125}I .

Resulta así que el componente de movilidad catódica, mayoritario en el material de la columna de Sephacryl S-200 asimilado al fragmento Fv, no contiene péptidos de la cadena ligera, sino de los presentes en el mapa de Fd_u y no todos, lo cual permite identificarlo como el dominio V_H de la IgM Iz. Por el contrario, la fracción no retenida en la columna de CM-celulosa da un mapa más complejo, en el que la mayoría de sus péptidos son comunes a los de la cadena ligera, por lo que puede pensarse que se trate del dominio V_L . Esto se hallaría de acuerdo, además, con la alteración de su movilidad electroforética en poliacrilamida tras su reducción con DTT, figura III.49., cambio que también presenta la cadena ligera intacta y que entonces puede ser atribuido a la reducción del puente disulfuro de su dominio V_L .

A la vista de esto, los anteriores resultados cromatográficos y electroforéticos pueden interpretarse suponiendo que en el fragmento Fv de la IgM Iz sus dominios V_H y V_L se hallan asociados a través de una interacción débil, que determinaría su separación en un intercambiador iónico en condiciones no disociantes, de modo que mientras el componen-

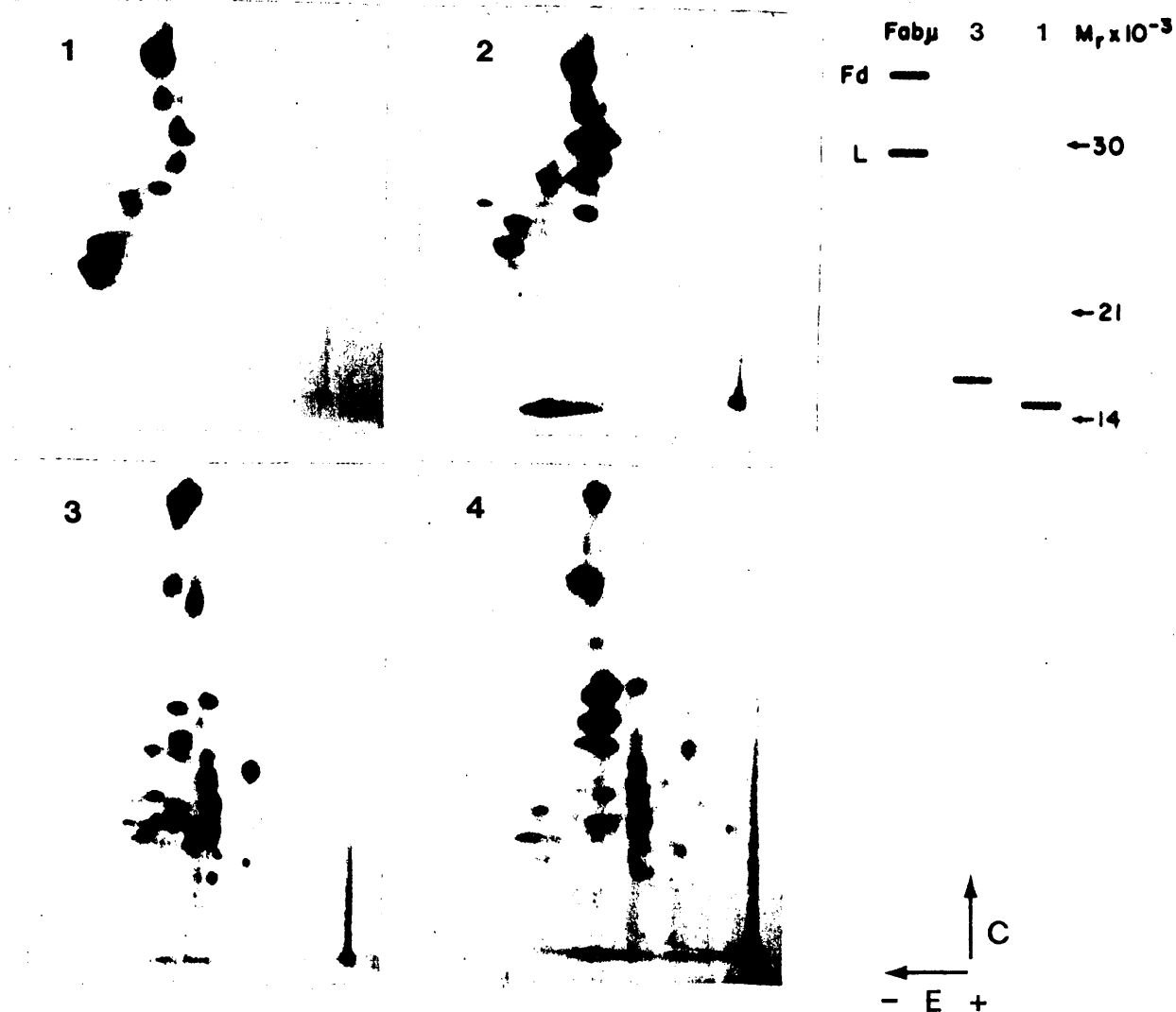


Figura III.48. Identificación de los dominios variables de la IgM Iz. Se muestran los autorradiogramas de los mapas peptídicos obtenidos tras electroforesis, E, y cromatografía, C, de los péptidos trípticos del material marcado con ^{125}I contenido en las bandas observadas tras SDS-PAGE de $Fab\mu$ reducido (figuras III.27. y III.35.), $Fd\mu$ (2) y L (4), así como de las fracciones unida (1) y no unida (3) de Fv Iz a CM-celulosa (figura III.49.) tal como se ha esquematizado. Los mapas se han hecho en cromatofolios de celulosa, como se describe en II:7., y para la autorradiografía se han utilizado películas X-OMAT MA de Kodak, en chasis sin pantallas intensificadoras.

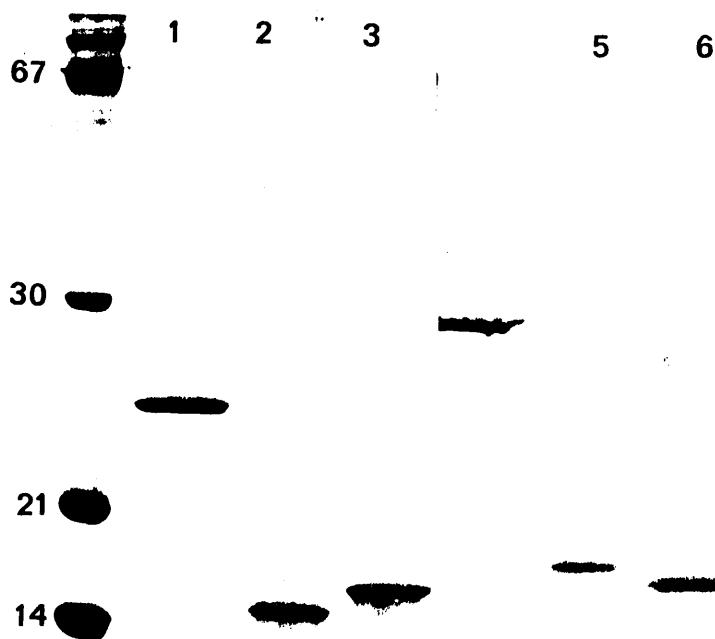


Figura III.49. Análisis por SDS-PAGE de los dominios variables de la IgM Iz. Electroforesis de V_H (3 y 6), V_L (2 y 5) y cadena ligera Iz (1 y 4) reducidos (4-6) y sin reducir (1-3), en un gel de 3.5%C y 12.5%T. Se señalan los valores de M_r ($\times 10^{-3}$) de los marcadores de peso molecular utilizados.

te básico, V_H , se fija a la carboximetilcelulosa, el de movilidad aniónica, es arrastrado en el tampón de elución, aunque pueden aparecer mezclados en una zona del cromatograma como la cola del primer pico (figura III.45.). Del mismo modo, en un campo eléctrico, y teniendo movilidades opuestas, podría resultar favorecida la disociación de ambos dominios. Si ésta no es simultánea para todos los F_v y teniendo en cuenta que entonces, el fin de la electroforesis en agarosa, no sería una situación de equilibrio, puede tenerse el patrón heterogéneo observado, con bandas de movilidades intermedias a las de cada uno de ellos.

Por otro lado, el antisuero producido contra esta región V_H no reconoce, como era de esperar, ni a V_L ni a la cadena ligera, dando reacción de identidad con el fragmento F_v , figura III.50.. Curiosamente no es capaz de producir líneas de precipitación con el Fab_μ , pero sí con la IgM intacta, lo cual tiende a indicar que reconocería un solo determinante antigénico en V_H de Fab_μ (fijarse en la posible disolución de la línea de precipitación con IgM en el extremo correspondiente al pocillo con Fab_μ), y en todo caso asegura la identidad de ese material con la región V_H asignada.

III.3.8. Inhibición competitiva de la unión de IgM- $\{^{125}I\}$ a proteína A por subfragmentos de Fab_μ .

En experimentos de inhibición competitiva de la unión de IgM Iz a PA puede apreciarse, figura III.51., que el

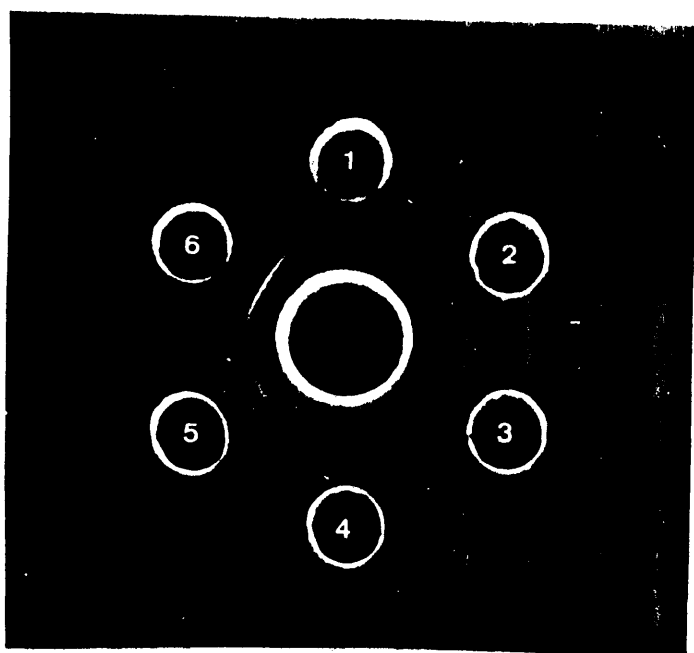


Figura III.50. Antigenicidad del dominio V_H Iz. Doble inmunodifusión en agarosa con 3% PEG 6000, p/v, de IgM (1), Fab_μ (2), V_L (3), cadena L (4), Fv (5) y V_H (6), todos de la IgM Iz, contra un suero anti-dominio V_H Iz.

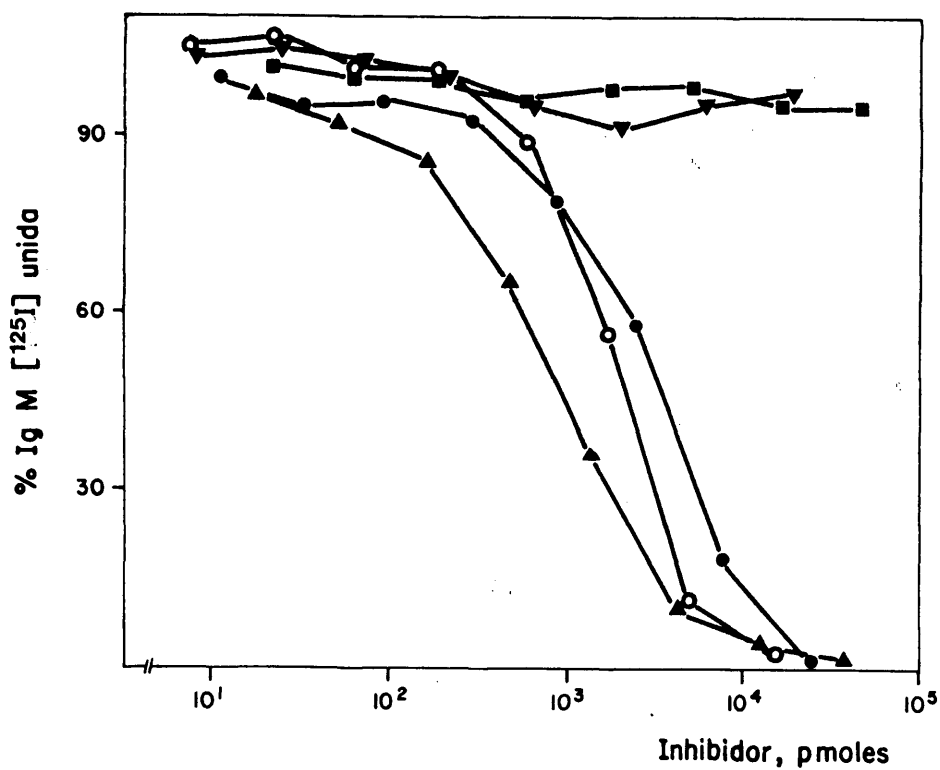


Figura III.51. Inhibición competitiva de la fijación de IgM Iz a proteína A. 10-20 ng de IgM-Iz{¹²⁵I}, 50000 cpm, se mezclan con soluciones de concentración variable de cadenas ligeras Iz (▼), V_H (▲), V_L (■), Fv (●) y de Fabμ (○), antes de añadirse a placas de PVC previamente cubiertas con 50 μl de PA, 1 μg/ml. Tras 2 horas de incubación se cuentan los pocillos y se calcula la fracción de IgM-Iz{¹²⁵I} unida según II.9.2..

efecto inhibidor propio del fragmento Fab_μ es conservado por su región Fv, así como por la región V_H de la misma, que incluso presenta una eficiencia inhibidora algo mayor. En el mismo ensayo el dominio V_L muestra, como la cadena ligera intacta, ausencia total de actividad, lo cual permite descartar la implicación de estructuras de este polipéptido en la interacción de la IgM Iz con la PA, por sí mismas o estabilizando conformacionalmente, por su asociación en Fv o Fab, al sitio receptor en V_H.

III.3.9. Inhibición de la coprecipitación de la IgM Iz con proteína A y Fc_γ por subfragmentos de Fab_μ.

Asímismo, como se muestra en la figura III.52., el fragmento V_H es tan activo como los Fab_μ y Fv en la inhibición de la reacción de coprecipitación de la IgM Iz, a diferencia de la cadena ligera o la región V_L.

III.3.10. Inhibición de la fijación de IgM Iz a proteína A por anticuerpos anti-V_H.

Cuando, en otro tipo de ensayo, se estudia el efecto del bloqueo de sitios antigénicos de la IgM sobre su interacción con la PA, puede apreciarse, figura III.53A., cómo la ocupación de determinantes de su región V_H por fragmentos Fab de anticuerpos purificados de un suero anti-V_H por cromatografía de afinidad con V_H(Iz)-Sephrose (II.3.2.1.2.), deter-

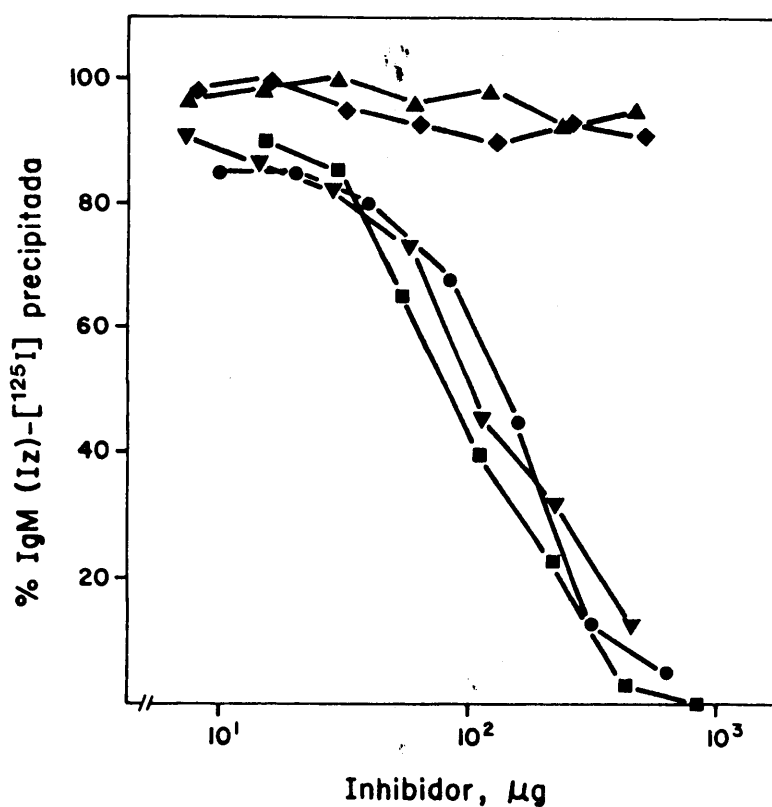


Figura III.52. Inhibición de la coprecipitación de IgM Iz con proteína A y Fcγ. En tubos de microfuga de 0.4 ml se mezclan 50 μl de Fcγ, 20 μg/ml, e IgM-Iz{¹²⁵I}, 1.6 μg/ml, y 50 μl de soluciones de concentración variable de Fabμ (■), Fv (▼), V_H (●), cadena L Iz (▲) y Fcμ (◆), añadiendo, finalmente, 25 μl de PA 0.4 μg/ml. La fracción de IgM-Iz{¹²⁵I} precipitada se calcula a partir de la radiactividad precipitada tras 21 horas a temperatura ambiente (II.9.4.).

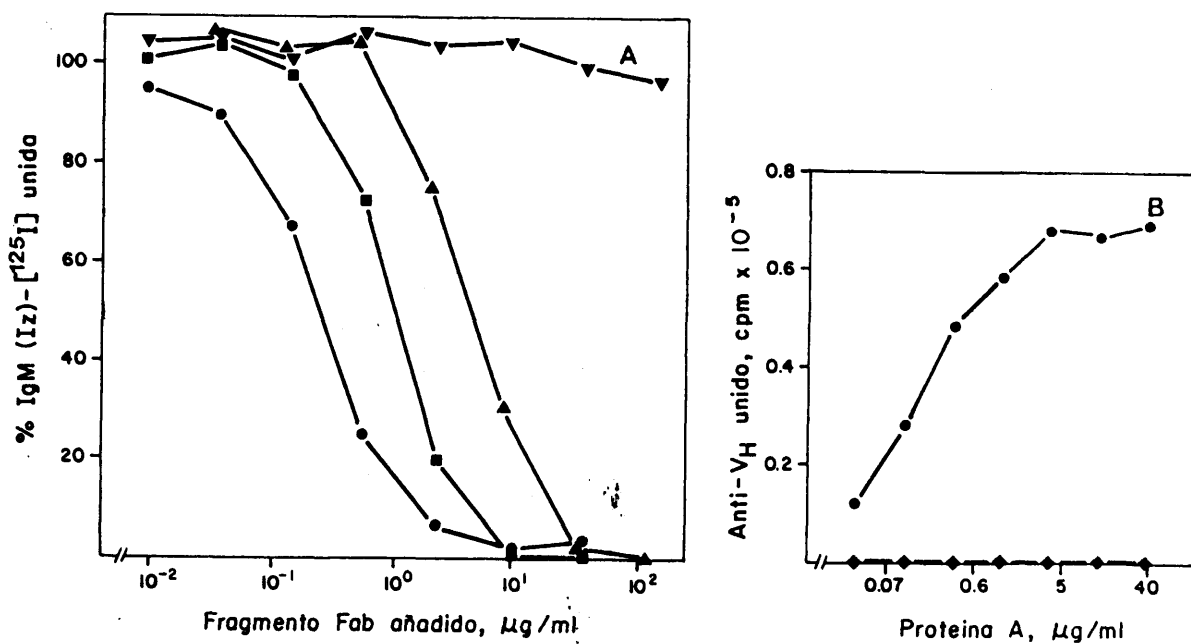


Figura III.53. Efecto del bloqueo de sitios antigénicos en V_H de la IgM Iz sobre su interacción con proteína A.

A, inhibición de la fijación de IgM Iz a PA por fragmentos Fab de anticuerpos anti-IgM Iz y anti- V_H Iz. 10-20 ng de IgM-Iz $\{^{125}\text{I}\}$, 54000 cpm, se incuban en placas de PVC con soluciones de concentración variable de Fab anti- V_H (■), Fab anti-IgM Iz (H+L) (▲), Fab anti-IgM Iz (H+L) eluido de $V_H(\text{Iz})$ -Sephadex (●) y Fab de conejo no inmune (▼). Tras 2.5 horas, 50 de los 60 μl de estas mezclas se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 μl de PA 1 $\mu\text{g/ml}$. La fracción de IgM Iz unida se calcula como se indica en II.9.2..

B, fijación de Fab anti- V_H Iz marcado con ^{125}I (◆) o de IgG $\{^{125}\text{I}\}$ de conejo (●), 150000 cpm en 50 μl , a placas de PVC previamente cubiertas con soluciones de concentración variable de PA. Se representa la radiactividad unida tras 1 hora de incubación.

mina la incapacidad de fijación de la IgM a la PA de modo específico, si se considera la ausencia de efecto alguno de fragmentos Fab antigénicamente no relacionados con PA o IgM. Puesto que, además, la reactividad con PA de estos Fab anti- V_H , estimada a partir de la fracción de anticuerpo radiactivo que se fija a placas con PA, es insignificante, figura III.53B., puede considerarse que el efecto observado se halla asociado, exclusivamente, al bloqueo de determinantes antigénicos de la IgM Iz.

En la figura III.53 puede apreciarse, asimismo, que la actividad de los anticuerpos anti- V_H purificados de modo análogo a partir de un suero contra la IgM Iz, es incluso superior a la de los anticuerpos del suero anti- V_H .

Aunque en los dos casos se han obtenido por su unión al dominio V_H aislado, del suero anti- V_H , correspondiente a la inmunización con V_H Iz, es posible que, como se ha descrito (Kubagawa y col., 1982), se tengan anticuerpos contra sitios inaccesibles del dominio variable tal como se encuentra en la molécula de IgM: los anticuerpos del mismo antisuero, purificados por cromatografía de afinidad con Fab μ (Iz)-Sephadex, muestran una capacidad de unión de V_H muy inferior, figura III.54C.

Así, las reactividades observadas para ambos tipos de anticuerpos, figuras III.54A,B. (los del suero anti- V_H reconocen mejor a su antígeno, la región V_H aislada, y unen

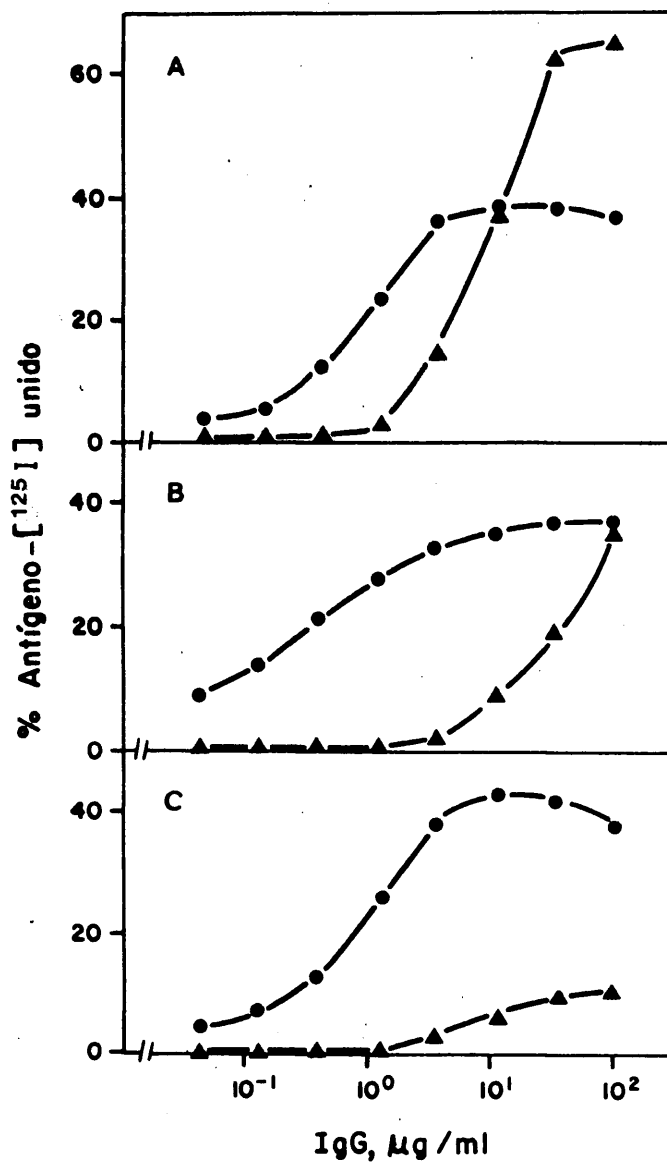


Figura III.54. Antigenicidad de los anticuerpos anti- V_H . Se representa la capacidad de fijación directa de 10-20 ng de IgM-Iz- ^{125}I (●) y 5-10 ng de V_H -Iz- ^{125}I (▲) a placas de PVC cubiertas con cantidades variables de anticuerpos IgG, purificados por cromatografía de afinidad en V_H (Iz)-Sephacrose, a partir de sueros anti- V_H Iz (A), anti-IgM Iz (B) o por cromatografía de afinidad en Fab (Iz)-Sephacrose de un suero anti- V_H Iz (C), estimada de la radiactividad fijada tras 2 horas, según II.8.2.

IgM en grado similar a los del suero anti-IgM, pero con afinidad algo menor), permiten interpretar sus distintos efectos inhibidores de la unión a PA de la IgM Iz en términos de las especificidades de los anticuerpos de cada antisuero implicadas en el reconocimiento de la región V_H en la IgM.

Estos resultados, obtenidos con la molécula Iz entera, por un procedimiento diferente, se hallan completamente de acuerdo con los anteriores correspondientes a sus fragmentos, y así apoyan convenientemente la localización, apuntada entonces, del sitio reactivo con PA de la IgM Iz en sus dominios V_H .

III.4. RECEPTOR DE PROTEINA A EN ESTRUCTURAS DE DOMINIOS VARIABLES DE CADENAS PESADAS

La asociación del sitio a través del que la IgM Iz se une a la PA con estructuras localizadas en su región V_H , ayuda, asimismo, a descartar que esta reactividad se halle relacionada con una posible, y no comprobada, actividad anticorpal de esta inmunoglobulina contra la PA, por medio de los sitios combinatorios definidos por las regiones determinantes de complementaridad de sus dominios V_H y V_L , que, por otro lado, habría determinado una interacción más eficaz de Fabu y Fv que la observada con V_H . No obstante, el poder extender esta idea a otras proteínas IgM, contribuiría a establecer la generalidad de la conclusión deducida aquí con una proteína

monoclonal y, sobre todo, serviría para averiguar si éste puede ser el mecanismo de interacción de las inmunoglobulinas M o de otras clases, reactivas con la PA a través de sus regiones Fab.

III.4.1. Inhibición de la interacción proteína A-IgM policlonal por anticuerpos anti-Fab_μ.

Del mismo modo que anticuerpos contra la IgM Iz o contra su región V_H interfieren su unión a la PA, fragmentos Fab de anticuerpos producidos contra la IgM policlonal reactiva con PA-Sepharose, también son capaces de inhibir la fijación de IgM policlonal a células de *S. aureus*, tal como puede observarse en la figura III.55..

Si esos fragmentos Fab anti-IgM se absorben en columnas de Fab_μ(Iz)-Sepharose o (Fc)_{5μ}-Sepharose (II.3.2.1.2.), se obtienen fracciones sin reactividad contra determinantes antigénicos presentes en esas regiones de la IgM, que se comportan de modo muy distinto en el mismo ensayo, figura III.55., pues en tanto que la ausencia de fragmentos Fab que reconocen la región (Fc)_{5μ} no afecta a la capacidad inhibidora observada con la mezcla de Fab contra toda la molécula de IgM, la absorción de los Fab reactivos con determinantes de la región Fab_μ determina la pérdida de dicha actividad.

Como la IgM Iz, la IgM policlonal parece tener sus sitios reactivos con la PA en las regiones Fab_μ, e incluso su

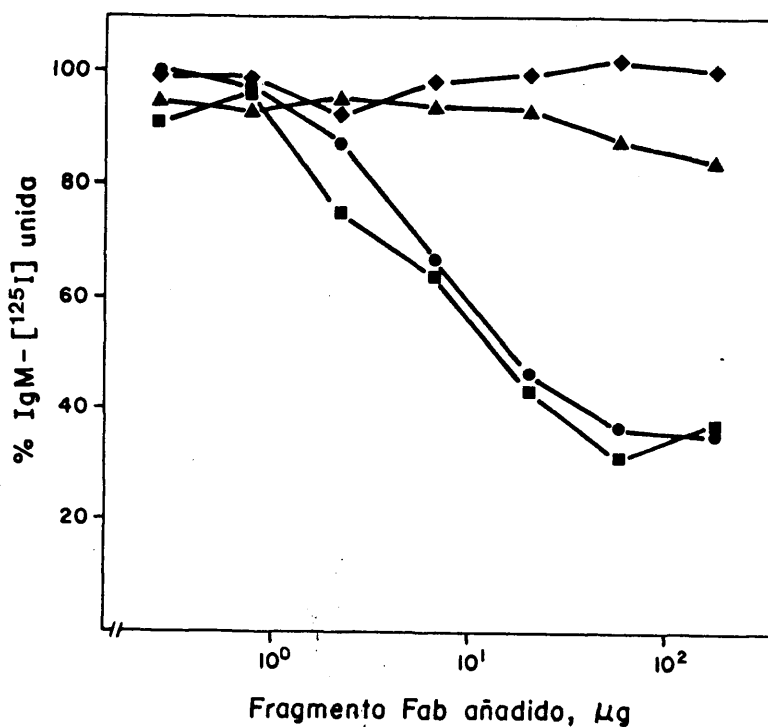


Figura III.55. Inhibición de la fijación de IgM policlonal a *S. aureus* por fragmentos Fab de anticuerpos anti-IgM policlonal. 1 μg de $\text{IgM}\{^{125}\text{I}\}$, 100000 cpm, se mezcla en un volumen final de 100 μl con soluciones de concentración variable de Fab anti-IgM(H+L) (●), y de las fracciones de estos Fab absorbidas con $(\text{Fc})_5\mu\text{-Sepharose}$ (■) o con $\text{Fab}_\mu\text{-Sepharose}$ (▲), así como con Fab de conejo no inmune (◆), en tubos de microfuga de 0,4 ml. 2 horas después se añaden 50 μl de una suspensión 0.2% de estafilococos, v/v, determinando la radiactividad fijada a las bacterias tras 2 horas, como se indica en II.9.1..

reacción de coprecipitación es completamente inhibida por fragmentos Fab del suero anti-IgM policlonal que son retenidos en la columna de $\text{Fab}_\mu(\text{Iz})$ -Sephadex, pero no por los retenidos en la columna de $(\text{Fc})_{5\mu}$ -Sephadex, figura III.56., en un resultado que, como era de esperar, está de acuerdo con los de la figura III.55., en el sentido de que éstos Fab anti- Fab_μ son los activos en la inhibición de la unión de IgM a la PA, y que cuando son retirados por absorción de la mezcla total anti-IgM, dejan a esta preparación sin efecto inhibitorio.

III.4.2. Inhibición de la fijación de IgM policlonal a proteína A por anticuerpos anti- V_H .

Puesto que la IgM Iz, proteína donante del fragmento Fab_μ utilizado en la absorción de los anticuerpos anti-IgM policlonal, tiene en su región V_H el sitio reactivo con PA (III.3.8.), se quiso averiguar si entre los Fab anti-IgM reactivos con Fab_μ Iz hay fragmentos con especificidad contra su región V_H , para evaluar la actividad que les corresponde en el efecto observado con los anticuerpos anti-IgM (figura III.56.), aislados por cromatografía de afinidad con $\text{Fab}_\mu(\text{Iz})$ -Sephadex.

De estos anticuerpos anti- Fab_μ , una importante fracción es retenida en $V_H(\text{Iz})$ -Sephadex, alrededor del 35%, y cuando se ensaya su efecto sobre la fijación de IgM policlonal a PA se observa que son más activos que los anti- Fab_μ , figura III.57., como había de esperarse si se produjese un

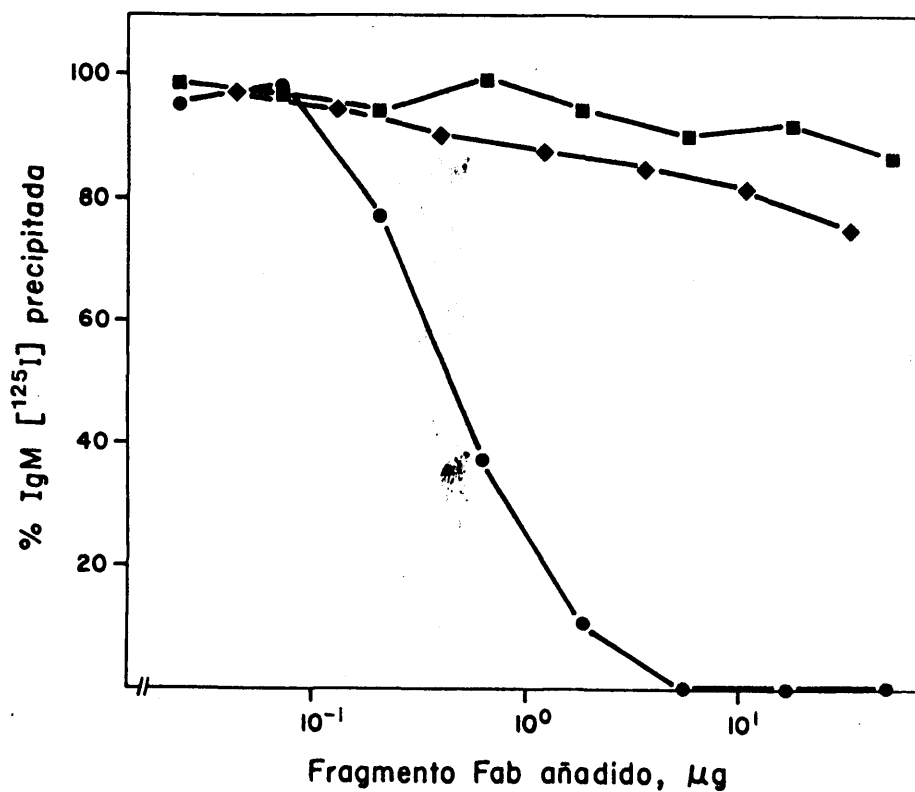


Figura III.56. Inhibición de la coprecipitación de IgM policlonal con proteína A y $\text{Fc}\gamma$ por fragmentos Fab anti-IgM policlonal. En tubos de microfuga de 0.4 ml se mezclan 50 μl con $\text{IgM}\{^{125}\text{I}\}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y $\text{Fc}\gamma$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con 50 μl de soluciones de concentración variable de fragmentos Fab anti-IgM(H+L) eluidos de $(\text{Fc})_5\mu$ -Sepharose (◆) o de $\text{Fab}\mu$ -Sepharose (●), o de Fab de conejo no inmune (■), añadiendo, finalmente, 25 μl de PA 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La fracción de $\text{IgM}\{^{125}\text{I}\}$ precipitada, se calcula a partir de la radiactividad precipitada tras 20 horas, según II.9.4...

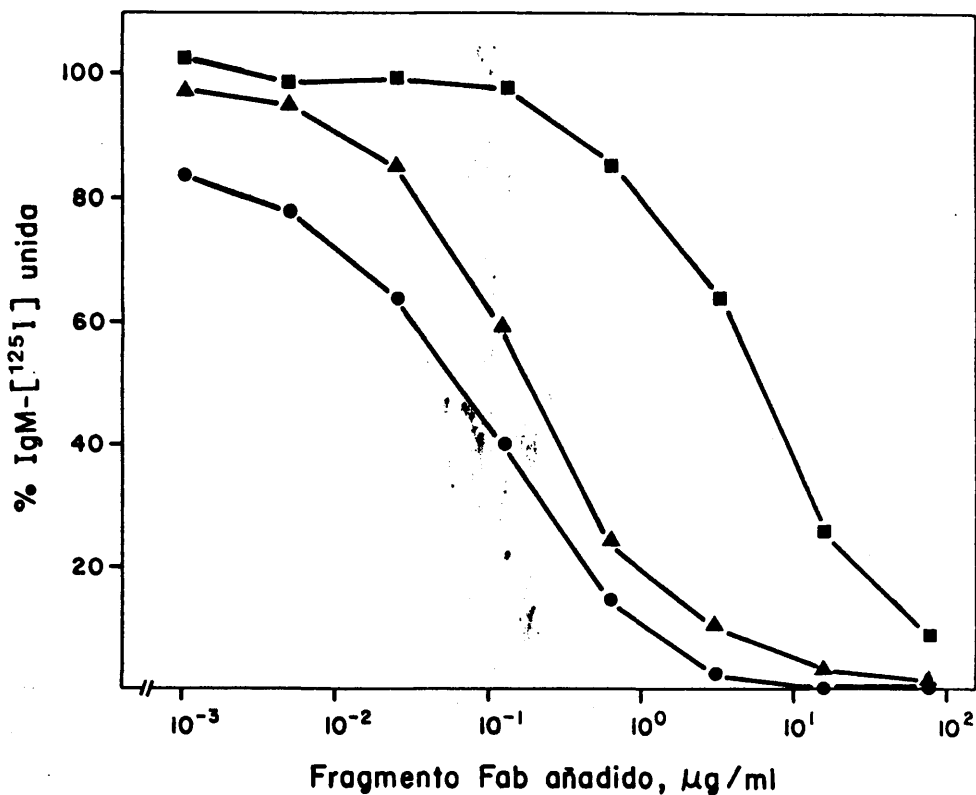


Figura III.57. Inhibición de la fijación de IgM policlonal a proteína A por fragmentos Fab anti-Fab. 10-20 ng de IgM policlonal marcada con ¹²⁵I, 50000 cpm, se mezclan con soluciones de concentración variable de Fab anti-IgM policlonal eluido de Fab(Iz)-Sephadex (▲) y de sus fracciones unida (●) y no unida (■) a V_H(Iz)-Sephadex. Después de 2 horas, 50 de los 60 µl de estas mezclas, se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 µl de PA 1 µg/ml, y la fracción de IgM(¹²⁵I) unida se calcula a partir de la radiactividad fijada tras 1.5 horas, según II.9.2..

enriquecimiento en los anticuerpos relevantes en esa inhibición, al tiempo que la fracción sin afinidad por la columna debía poseer una actividad inhibidora mucho menos acusada, que es lo que puede apreciarse en la misma figura. Esto permite suponer que es la ocupación de los sitios antigénicos de la región V_H de la IgM policlonal lo que prioritariamente afecta su unión a la PA y que, por tanto, es posible que las estructuras a través de las que se produce tal interacción se localicen en los dominios variables de sus cadenas pesadas.

Que la fracción de Fab no unida a la columna de $V_H(Iz)$ -Sephrose conserve actividad inhibidora puede deberse a que anticuerpos contra determinantes estructurales, definidos por las áreas de contacto interdominios, V_H-V_L , V_H-C_H1 , u otras en esa zona de la molécula (Miller y Terry, 1968; Jensenius y col., 1982a), no presentes en $V_H(Iz)$ -Sephrose, al unirse a la IgM puedan afectar su interacción con PA por impedimentos estéricos o alteraciones conformacionales del receptor localizado en su proximidad.

Así, en la figura III.58. puede advertirse que en tanto los Fab no retenidos en $V_H(Iz)$ -Sephrose no inhiben la unión de V_H a anticuerpos contra IgM policlonal, purificados en la misma columna de afinidad, son Fab sin reactividad contra este dominio, sí afectan parcialmente la unión de la IgM a esos mismos anticuerpos. Mientras, los Fab anti- V_H inhiben completamente ambas fijaciones. Adicionalmente, la diferencia de actividad antigénica de los anticuerpos anti-Fab μ , tras su ab-

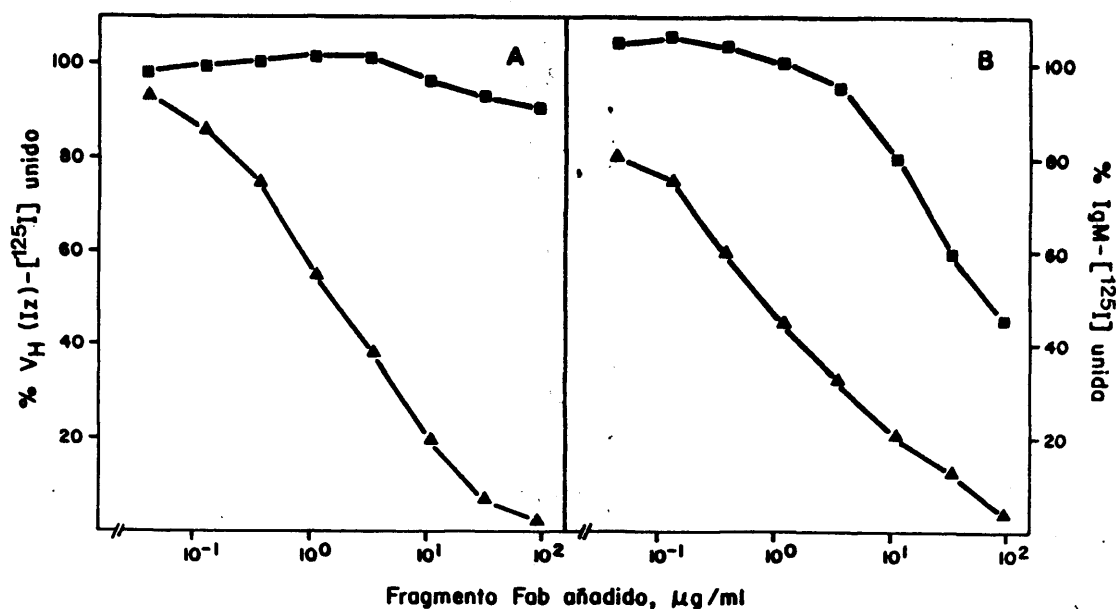


Figura III.58. Reactividad anti- V_H de los Fab anti-Fab μ , de un suero anti-IgM policlonal, unido y no unido a $V_H(Iz)$ -Sephadex. 10 ng de $V_H(Iz)-[^{125}I]$, 25000 cpm, y 20 ng de IgM policlonal marcada con ^{125}I , 45000 cpm, se mezclan con soluciones de concentración variable de Fab anti-Fab μ unido (▲) y no unido (■) a $V_H(Iz)$ -Sephadex, en un volumen final de 60 μl . Después de 2 horas, 50 μl de estas mezclas se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 μl de IgG anti-IgM policlonal eluida de $V_H(Iz)$ -Sephadex 12 $\mu\text{g/ml}$ (A) y 1.2 $\mu\text{g/ml}$ (B). Las fracciones de $V_H[^{125}I]$ y de $IgM[^{125}I]$ unidas se calcula a partir de la radiactividad fijada tras 1.5 horas, según II.8.2.. Las cantidades de anticuerpo insolubilizado en cada caso, unen $\approx 50\%$ de $V_H[^{125}I]$ e $IgM[^{125}I]$ del ensayo.

absorción con $V_H(Iz)$ -Sepharsé, respecto de la fracción retenida, es del mismo orden que la observada para su efecto inhibidor de la fijación de IgM a PA, requiriéndose en cada caso una concentración aproximadamente 90 veces mayor de los Fab no unidos a $V_H(Iz)$ -Sepharsé para conseguir un efecto equivalente.

Una inhibición similar de la interacción con PA, en reacciones de coprecipitación de IgM, ha sido descrita para anticuerpos contra una IgM monoclonal reactiva con PA, la proteína As, pero sin determinar la especificidad concreta de los mismos, sugiriendo, sin embargo, la implicación de determinantes conformacionales, en base a su no absorción por sus fragmentos $(Fc)_5\mu$ o $Fab\mu$, pero sí por sus subunidades (Grosv, 1975b).

III.4.3. Reactividad anti-"framework" de los anticuerpos que inhiben la interacción IgM-proteína A.

Las estructuras reconocidas por los Fab eluidos de $V_H(Iz)$ -Sepharsé se encuentran, además de en proteínas IgM, en inmunoglobulinas de otras clases, como puede observarse en la figura III.59A., en la que sus reactividades con estos anticuerpos, estimadas a partir de la competición con la IgM Iz por los Fab anti- V_H , resulta superior para la IgA que para la IgG. Asimismo, se han detectado también en una proteína IgE monoclonal, que es capaz de fijarse a los mismos anticuer-

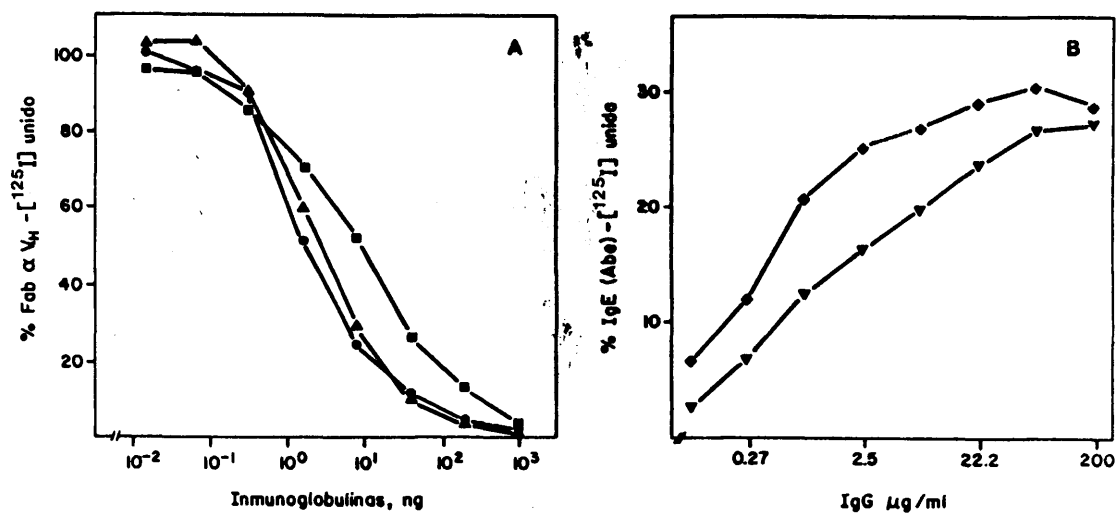


Figura III.59. Reactividad anti-"framework" de los anticuerpos anti- V_H del suero anti-IgM policlonal.

A, 40 μ l de soluciones de concentración variable de IgM (●), IgA (▲) e IgG (■) policlonales se añaden a 20 μ l de Fab anti- V_H - 125 I, 25000 cpm (III.4.2.), dejándose toda la noche. Después, 50 μ l de estas mezclas se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 μ l de IgM Iz, 6 μ g/ml, y la fracción de anticuerpo unido se calcula a partir de la radiactividad fijada tras 1 hora, según II.8.2..

B, fijación directa de IgE-Abe- 125 I, 80000 cpm (regalo del Dr. Sánchez Madrid), a placas de PVC previamente cubiertas con anticuerpos IgG purificados de un suero anti-IgM policlonal por cromatografía de afinidad con Fab μ -Sepharose (◆) o con V_H -Sepharose (▼). Se representa la fracción de IgE unida tras 2 horas de incubación.

pos insolubilizados en plástico, figura III.59B..

El reconocimiento de determinantes antigénicos comunes a inmunoglobulinas policlonales de las distintas clases por la fracción del conjunto de anticuerpos producidos en la inmunización con IgM humana eluida de PA-Sepharose, obtenidos por cromatografía de afinidad con $V_H(Iz)$ -Sepharose, define la especificidad anti-regiones "framework" de los dominios variables de cadena pesada de los Fab anti- V_H considerados. Aunque escasamente estudiada, la producción de anticuerpos contra determinantes específicos de regiones V_H en la inmunización con inmunoglobulinas intactas, cuenta con algunos precedentes (Stanilawski y Mittard, 1979; Jensenius y col., 1982b).

Esta especificidad se ha comprobado para proteínas IgG, figura III.60., observándose que estos anticuerpos no se unen a sus cadenas ligeras, ni al fragmento $Fc\gamma$. Tampoco se fijan a una proteína IgG3 monoclonal que no es retenida en PA-Sepharose, ni inhibe la unión de IgM a PA, figura III.63., por lo que su reactividad debe limitarse a estructuras antigénicas del dominio V_H .

Anticuerpos de especificidad relacionada se encuentran también en los antisueros producidos contra IgG normal o IgA de calostro, ya que, como se observa en la figura III.61., la fracción de ellos que es purificada por cromatografía de afinidad con $Fab\gamma$ -Sepharose, es capaz de inhibir la

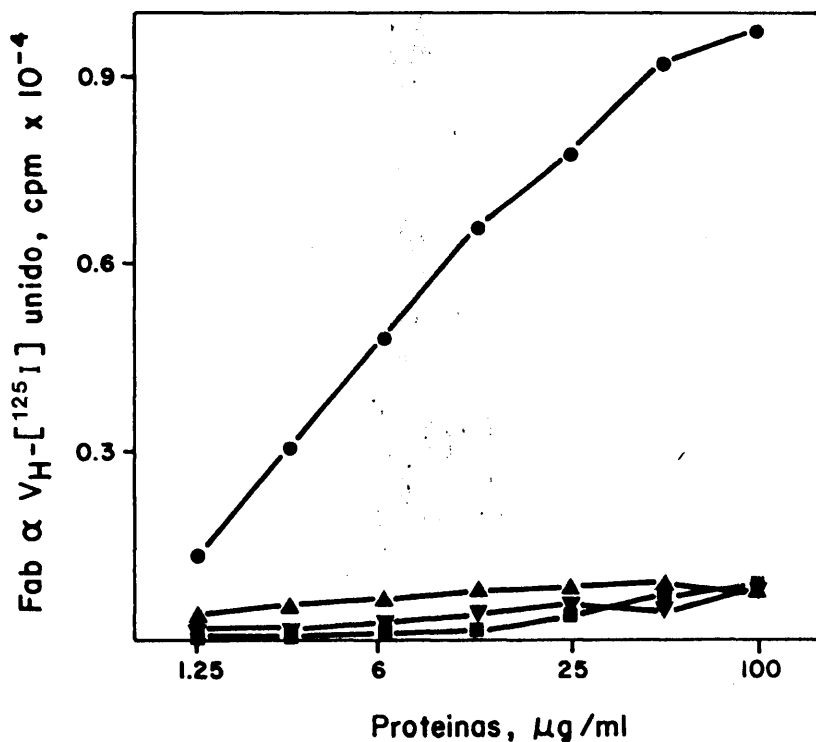


Figura III.60. Especificidad de los anticuerpos anti-IgM policlona eluidos de V_H -Sepharose. A placas de PVC rígido, previamente cubiertas con 50 μl de soluciones de concentración variable de IgG (●), IgG3 Fra (▲), cadenas ligeras policlonales (■) y de $\text{Fc}\gamma$ (▼), se añaden 50 μl de Fab anti-IgM eluido de V_H -Sepharose (III.4.2.) marcado con ^{125}I , 50000 cpm. Tras 1 hora se cuenta la radiactividad unida a los pocillos, como se indica en II.8.2..

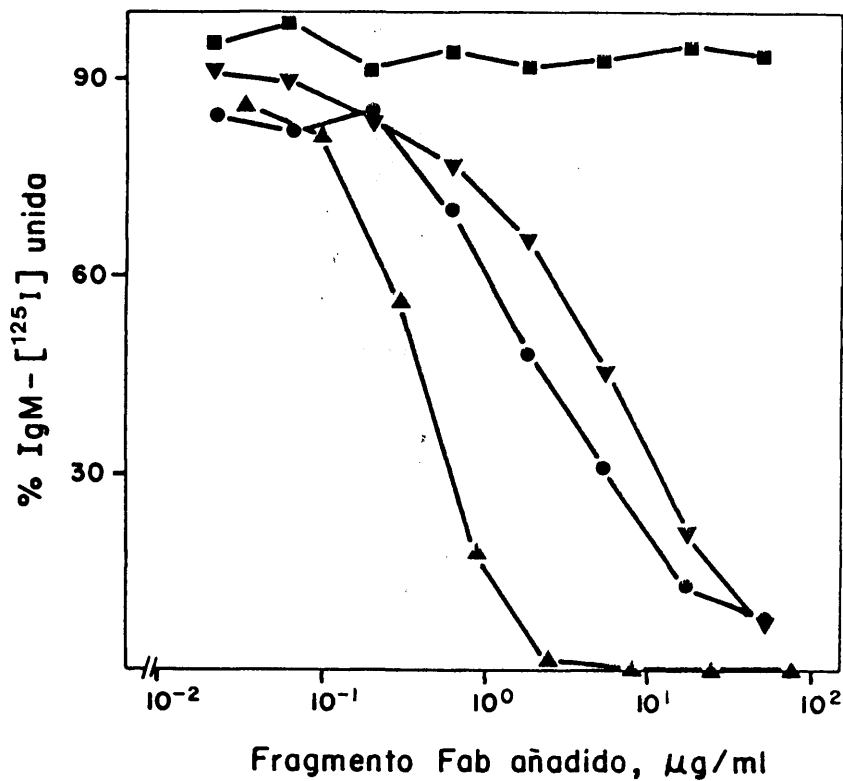


Figura III.61. Inhibición de la fijación de IgM policlonal a proteína A por fragmentos Fab de anticuerpos anti-Fab. 20 ng de IgM policlonal marcada con ^{125}I , 60000 cpm, se mezclan con soluciones de concentración variable de Fab anti-IgM policlonal eluido de Faby-Sepharose (▲), Fab anti-IgG eluido de Faby-Sepharose (●), Fab anti-IgA eluido de Faby-Sepharose (▼) y Fab de IgG de conejo no inmune (■), en un volumen final de 60 µl. Tras 2 horas, 50 µl de estas mezclas se ponen en placas de PVC, previamente cubiertas con 50 µl de PA 0.4 µg/ml, y la fracción de IgM $\{^{125}\text{I}\}$ unida se calcula a partir de la radiactividad fijada tras 2 horas, según II.9.2.

fijación de IgM policlonal a PA. Su menor efectividad inhibidora debe estar relacionada con una probable menor avidez por la IgM respecto de la de los anticuerpos anti-Fab μ , pero, en todo caso, son una muestra de la antigenicidad de algunas estructuras presentes en los dominios variables de inmunoglobulinas, capaces de inducir la formación de anticuerpos reactivos con gran número de estas regiones variables.

III.4.4. Relación de los sitios antigénicos en regiones "framework" de V_H y reactividad con proteína A.

La reactividad de estos anticuerpos anti-V_H del suero anti-IgM con la IgG policlonal se distribuye de modo desigual entre las distintas fracciones que se obtienen eluyendo la IgG unida a la columna de PA-Sepharose con tampones de acidez creciente, de manera que las obtenidas a pH más bajos unen mejor los fragmentos Fab anti-V_H que las eluidas con pH menos ácidos, las cuales fijan, aproximadamente, la mitad de anticuerpo, figura III.62..

Así, las IgG reconocidas preferentemente por los anticuerpos anti-"framework", son aquellas que dan reacciones de precipitación directa con PA, figura III.16., sugiriendo que la presencia simultánea de reactividades en sus regiones Fc γ y Fab γ determina su capacidad de formación de complejos precipitables, a diferencia de las no precipitantes, que deben interaccionar con la PA fundamentalmente sólo a través de

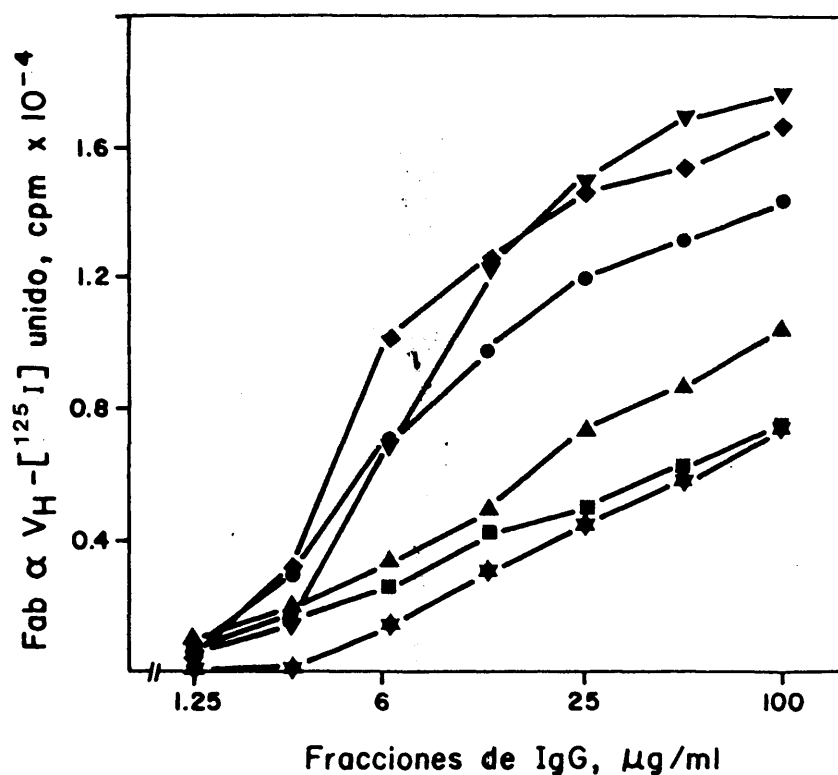


Figura III.62. Reactividad "framework" V_H de las fracciones de IgG policlonal eluidas de PA-Sepharose. A placas de PVC rígido, previamente cubiertas con 50 μl de soluciones de concentración variable de IgG eluida de PA-Sepharose a pH 6.1 (\star), 5.1 (\blacksquare), 4.4 (\blacktriangle), 4.0 (\bullet), 3.4 (\blacktriangledown) y 2.5 (\blacklozenge), se añaden 50 μl de Fab anti- V_H [^{125}I] (III.4.2.), 50000 cpm. Tras 1 hora se cuenta la radiactividad unida a los pocillos, como se indica en II.8.2..

su región $Fc\gamma$. Desde luego, esta diferente reactividad de las fracciones de IgG se aprecia en la inhibición competitiva de la fijación de IgM policlonal a PA, figura III.63., donde mientras la actividad de la IgG de una de las fracciones precipitantes, la eluida a pH 3.4, es mayor que la del conjunto de IgG, la de una de las fracciones no precipitantes es casi imperceptible. En la misma figura se incluye el efecto inhibidor de la IgA policlonal, también algo mayor que el de la IgG, pero ambos menores, unas 10 y 30 veces, respectivamente, que el de la IgM, la cual manifiesta la mayor avidez por la PA, con una K_a calculada en este ensayo de 0.2×10^9 l/mol, del orden de la medida en la fijación a células de *S. aureus* (III.1.2.2.).

Surge así una relación entre la presencia de estructuras reactivas con PA en el fragmento Fab de las inmunoglobulinas y sus determinantes antigénicos reconocidos por anticuerpos contra los segmentos "framework" del dominio variable de la cadena pesada, la cual sugiere que la localización del receptor de PA que media la interacción alternativa, asociada al Fab, con la región V_H de las inmunoglobulinas.

Los anticuerpos anti-"framework" considerados aquí en relación con la unión a PA por medio de los dominios V_H , no muestran, sin embargo, una reactividad con las distintas inmunoglobulinas estrictamente ajustada a la correspondiente de éstas con la PA, pues si bien existe una relación en tér-

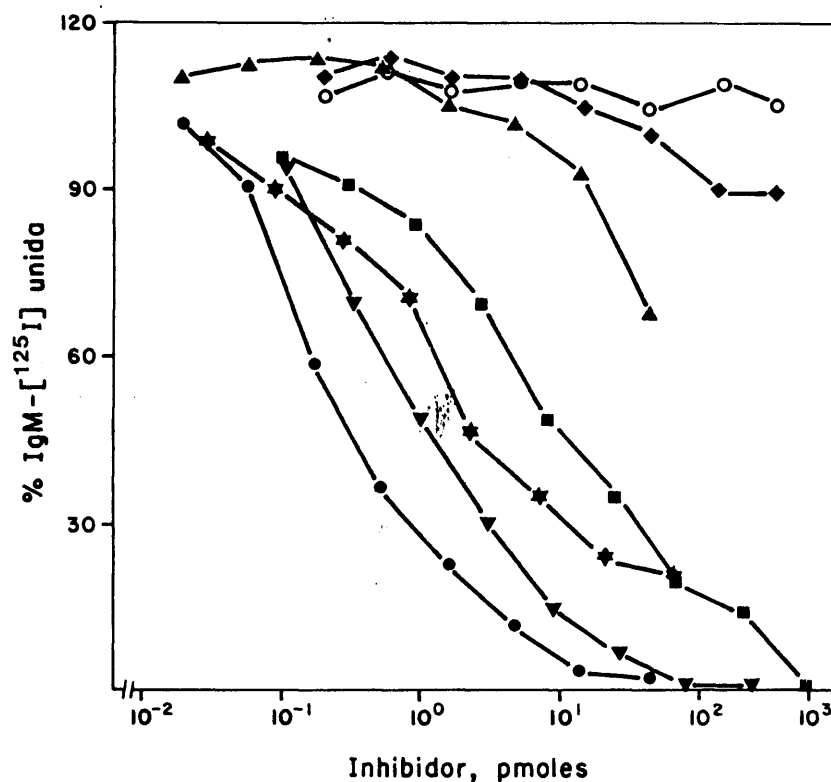


Figura III.63. Inhibición de la fijación de IgM policlonal a proteína A por IgA, IgG e IgM. 10-20 ng de IgM policlonal marcada con ^{125}I , 40000 cpm, se mezclan con soluciones de concentración variable de IgA (★), IgG (■), IgG3 Fra (○), IgG eluida de PA-Sepharose a pH 5.1 (◆), IgG eluida de PA-Sepharose a pH 3.4 (▼), IgM policlonal unida (●) y no unida (▲) a PA-Sepharose. Inmediatamente, 50 de los 60 μl de estas mezclas se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 μl de PA 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y la fracción de IgM{ ^{125}I } unida se calcula a partir de la radiactividad fijada después de 1.5 horas, según II.9.2..

minos cuantitativos, figuras III.62. y III.63., es cierto que proteínas poco o nada reactivas a través de sus regiones Fab, como la IgM monoclonal no retenida en PA-Sepharose, o las fracciones no precipitantes de IgG, manifiestan cierta actividad antigénica, como también puede apreciarse en las figuras III.62. y III.63., siendo una excepción la IgG3 Fra.

Como estos anticuerpos deben incluir más especificidades que las estrictamente asociadas al receptor de PA, es posible que reconozcan, aunque menos efectivamente, dominios sin reactividad o con muy baja afinidad por la PA, lo cual no presupone la imposibilidad de la preparación de anticuerpos de especificidad altamente selectiva que fueran capaces de distinguir más claramente entre dominios de distinta reactividad.

En el caso de las fracciones de IgM obtenidas en la elución de la columna de PA-Sepharose con tampones de pH variable, por consiguiente con dominios reactivos, la dificultad para poder apreciar diferencias antigénicas entre ellas, figura III.64., puede deberse, además, a que cada una de ellas forma parte del conjunto antigénico utilizado en la producción del antisuero del que se han aislado los anticuerpos anti-"framework" utilizados.

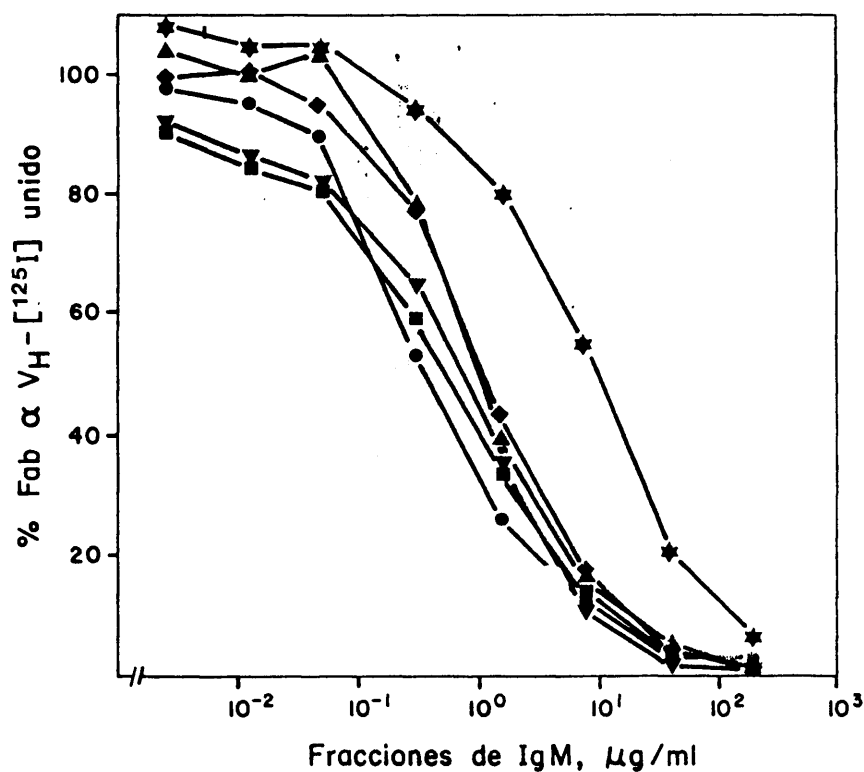


Figura III.64. Reactividad "framework" de las fracciones de IgM policlona eluidas de PA-Sepharose. A 40 μl de soluciones de concentración variable de IgM policlona unida (●) y no unida (★) a PA-Sepharose, así como de IgM eluida de PA-Sepharose a pH 4.4 (▲), pH 4.0 (▼), pH 3.4 (■) y pH 2.5 (◆), se añaden 20 μl de Fab anti- $V_H-^{125}I$, 20000 cpm (III.4.2.). Se dejan durante toda la noche y entonces 50 μl de estas mezclas se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 μl de IgM Iz, 6 $\mu g/ml$, y la fracción de anticuerpo unida se calcula a partir de la radiactividad unida tras 1 hora, según II.8.2..

III.4.5. Sitios antigénicos reconocidos por anticuerpos anti-"framework" humanos en inmunoglobulinas de otros mamíferos con reactividad tipo Fab con proteína A.

Además de las inmunoglobulinas humanas, las de otros mamíferos también manifiestan reactividad con PA de tipo alternativo, a través de sus regiones Fab (Inganas y col., 1980), por lo cual se examinaron las de algunos de ellos, para ver si presentasen homologías estructurales capaces de determinar sitios antigénicos que fuesen reconocidos por los Fab anti- V_H y compararlas con las de animales representativas del mecanismo clásico de interacción por medio de su región Fc.

En la figura III.65. se puede apreciar que de las inmunoglobulinas purificadas por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose, a partir del suero de estos animales, constituidas fundamentalmente por IgG (II.1.2.1.), llevan sitios antigénicos comunes con los de regiones V_H humanas, las de perro y cerdo, sobre todo, y también las de cobayo, que son inmunoglobulinas precipitantes con PA (Kronvall y col., 1970a), con reactividad tipo Fab (Inganas y col., 1980), a diferencia de las de conejo y vaca, que no son reconocidas por los anticuerpos anti-"framework", y son ejemplos característicos de inmunoglobulinas no precipitantes (Kronvall y col., 1970a), que interaccionan con la PA únicamente a través de sus regiones Fc γ (Inganas y col., 1980).

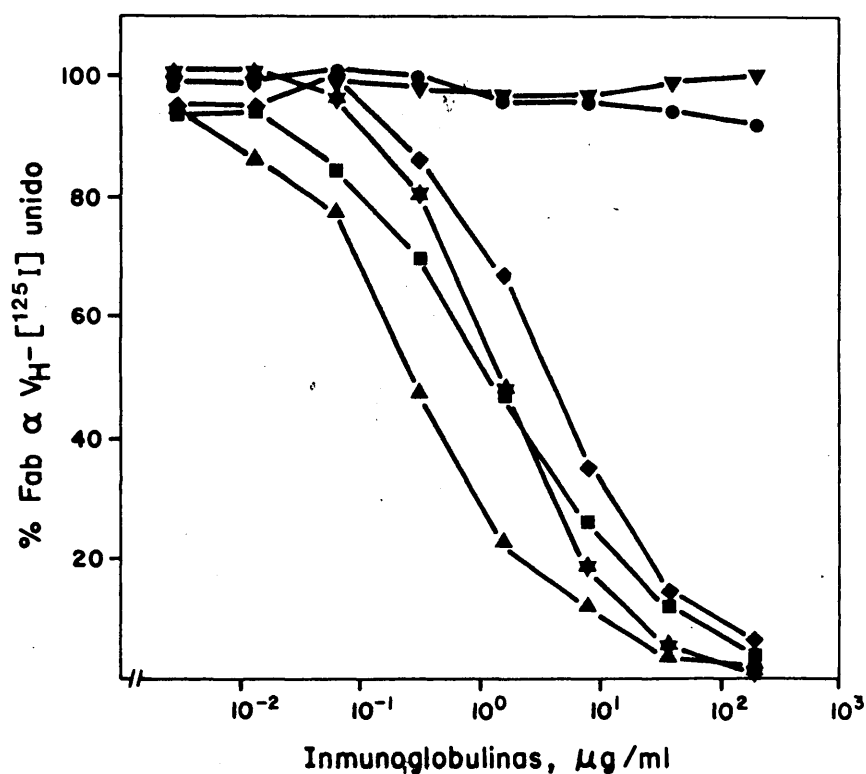


Figura III.65. Reactividad "framework" V_H humano de IgG de distintos mamíferos obtenida por cromatografía de afinidad con PA-Sepharose. A 40 μl de soluciones de concentración variable de inmunoglobulinas de conejo (▼), vaca (●), cobayo (◆), humano (★), cerdo (■) y perro (▲), se añaden 20 μl de Fab anti- V_H [^{125}I], 15000 cpm (III.4.2.), y se dejan durante toda la noche. Después, 50 μl de estas mezclas se ponen en placas de PVC previamente cubiertas con 50 μl de IgM Iz, 6 $\mu\text{g/ml}$, y la fracción de anticuerpo unida se calcula a partir de la radiactividad fijada tras 1 hora, según II.8.2..

Así pues, del mismo modo que las estructuras de la región $Fc\gamma$ que median la unión de las inmunoglobulinas a la molécula de PA se encuentran evolutivamente conservadas (Kronvall y col., 1970a), aquellas que median la interacción alternativa, a través de la región Fab, también parecen hallarse representadas en distintos grupos de mamíferos y, aunque no está probado, situarlas sobre los dominios variables de sus cadenas pesadas, constituye una sugerencia consecuente con la actividad antigénica apreciada con anticuerpos reactivos con los dominios homólogos de inmunoglobulinas humanas.

III.5. DISCUSION GENERAL

La reactividad de la proteína A de *S. aureus* con inmunoglobulinas humanas y de otros animales, ha venido considerándose hasta hace poco tiempo referida, principalmente, a proteínas IgG, en una interacción que fue asociada a su región Fc (Forsgren y Sjoquist, 1966), antes que a cualquier actividad relacionada con la función anticorpal de estas proteínas (Kronvall, 1967).

Entre tanto, la descripción de la reactividad de algunas proteínas monoclonales humanas de otras clases, IgA e IgM, con PA (Harboe y Folling, 1974; Grov, 1976), era considerada circunstancialmente, en relación con la individualidad de esas proteínas, ya que, al tiempo, las de otros mielomas de esas clases no mostraban dicha reactividad (Harboe y Folling, 1974; Salvedt y Harboe, 1976).

De hecho, y con fines prácticos, la creciente utilización de la PA en multitud de métodos inmunoquímicos (Goding, 1978), fundamentalmente como segundo anticuerpo generalizado o anti-IgG, no precisaba la consideración de la reactividad de inmunoglobulinas no IgG. Sin embargo, su manifestación por inmunoglobulinas de varios mamíferos (Goudswaard y col., 1978), así como su mecanismo, aparentemente distinto del comúnmente observado con IgG (Inganas y col., 1980), hacen necesario el estudio de esta nueva reactividad para un conocimiento más completo de la interacción

entre inmunoglobulinas y la PA de *S. aureus*.

En este apartado se inicia una discusión general de los resultados presentados anteriormente y que, derivados esencialmente de estudios con proteínas IgM, permiten extraer las conclusiones que se muestran en el capítulo IV.

III.5.1. IgM policlonal reactiva con proteína A.

La mayoría de los trabajos acerca de la reactividad de la IgM, se han efectuado con proteínas de mieloma (Harboe y Folling, 1974; Grötv, 1975; Inganas, 1981; Inganas y Johansson, 1981), planteándose, en primer lugar, para la consideración de la de IgM policlonal, la cuestión de su aislamiento.

El método de purificación que se ha utilizado (apartado II.1.5.), se basa en la observación de que cuando se cromatografía una muestra de suero humano normal en PA-Sepharose, la fracción del mismo retenida en la columna contiene cantidades pequeñas de IgM e IgA. Aunque representan sólo un 8-10% de la inmunoglobulina total (tabla III.3.), constituyen, sin embargo, el 30-40% de la IgM presente, valor que está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores en el estudio de la separación de anticuerpos anti-rubeola IgG e IgM, por cromatografía de los sueros individuales en columnas de PA-Sepharose (Field y col., 1980).

El método descrito produce una preparación de IgM de gran pureza (tabla III.1.) que, a diferencia de otros procedimientos, se obtiene rápidamente y con buen rendimiento. Presumiblemente, el método debe ser útil para sueros de otros animales cuyas IgM muestren reactividad con PA, destacando entre ellos los de perro (Goudswaard y col., 1978) y cerdo (Zikan, 1980b).

Todos los estudios de interacción de IgM policlonal con PA, se han efectuado con esta preparación, que contiene la fracción reactiva con PA del conjunto de IgM del suero normal y que, al parecer, presenta cierta variabilidad entre los sueros individuales (Grov, 1975a; Field y col., 1980), mostrando lo que probablemente sea el factor determinante del rendimiento del método en la purificación de IgM a partir de muestras individuales de suero.

Un primer grupo de experimentos con la IgM policlonal lo constituyen los de fijación directa a células de *S. aureus* de alto contenido en PA, como las de la cepa Cowan (apartado III.1.2.). El análisis de los resultados muestra que la asociación ocurre a través de un único tipo de sitios de unión en la molécula de PA, con una K_a de 10^9 l/mol (III.1.2.), que permite explicar su fijación a columnas de PA-Sepharose en presencia de concentraciones de IgG mayores, caso de las muestras de suero, como corresponde a un proceso de mayor afinidad que el de la fijación de IgG,

tal como se deduce de su menor K_a , 1.7×10^8 l/mol (III.1.2.) o de los valores inferiores calculados también para IgG policlonal y monoclonal en otros trabajos (Kronvall y col., 1970b; Myhre y Kronvall, 1980b; Lindmark y col., 1981).

Tanto en los experimentos de unión a bacterias, como en los de cromatografía en PA-Sepharose, resulta una mayor capacidad de fijación de IgG que de IgM (III.1.2.3.), a pesar de su aparente menor afinidad por la PA. Ello puede deberse, en parte, a la existencia de varios sitios de unión de PA en la molécula de IgM, tal como se deduce de la composición de los complejos formados en la reacción de coprecipitación de IgM, PA y Fc γ humano (III.1.3.1.).

La IgM, asimismo, es capaz de dar reacciones de precipitación directa con PA, que a diferencia de la de IgG precisa de PEG para la precipitación de los complejos formados (III.1.3.2. y III.1.3.3.), lo que sugiere que ambas reacciones suceden en cada caso a través de mecanismos diferentes.

La presencia simultánea de IgM y Fc γ en un mismo complejo con PA (III.1.3.1) plantea, por otro lado, la existencia en la molécula de PA de estructuras distintas para la unión de ambos componentes del complejo. Esto se halla de acuerdo, además, con la inhibición observada de la fijación de IgM a células de *S. aureus* por el fragmento F(ab') $_2\gamma$ pero no por el Fc γ (III.1.2.4.), lo que configura un patrón

de reactividad similar al tipo alternativo, a través de regiones Fab de inmunoglobulinas, inicialmente caracterizado con IgE policlonal humana (Inghanas y col., 1980).

III.5.2. Sitios de proteína A para las reactividades clásica y alternativa.

Otro resultado que pone de manifiesto la presencia en la PA de sitios diferentes para ambos tipos de reactividades, es el relativo a la inhibición de la reacción de coprecipitación de IgM policlonal con PA y Fc γ por el fragmento Fab γ , pero no por el F(ab') $_2\gamma$ (III.2.3.).

Esta dualidad de receptores en PA puede, adicionalmente, ser causa de las distintas capacidades de unión de IgM e IgG, aunque por ahora no pasa de ser una especulación. Así, a la multiplicidad teórica de sitios de unión de Fc γ en la PA (Sjodahl, 1977a), observada en la reacción de precipitación directa: 2 IgG por molécula de PA (Sjoquist y col., 1972a) y coprecipitación: 3 Fc γ por PA (III.1.3.1.), puede oponerse la correspondiente a sitios de unión de F(ab') $_2$ apuntada, por ejemplo, en la precipitación directa de IgM y PA (III.1.3.2.; Howell-Saxton y Wettstein, 1978).

Es posible, asimismo, que la representación curvilínea del análisis de Scatchard de los datos de fijación de IgG policlonal a células de *S. aureus* (III.1.2.2.), se co-

rrresponda con la unión a distintos sitios de PA, a través de sus regiones Fc o $F(ab')_2$, siendo esta última la de menor afinidad, de acuerdo con la pequeña fracción de $F(ab')_2\gamma$ o $Fab\gamma$ que resultan fijadas a grandes cantidades de *S. aureus* (Lancet y col., 1978; Myhre y Kronvall, 1980b).

No obstante, estos sitios de PA que unen $Fc\gamma$ y $F(ab')_2\gamma$, no parecen ser completamente independientes, a la vista de los resultados de los experimentos de inhibición competitiva de la fijación de $F(ab')_2\gamma$ y $Fc\gamma$ a *S. aureus* (III.2.1.), pues a altas concentraciones se observan efectos de inhibición recíprocos, débiles e incompletos, como el debido a $Fc\gamma$ en la fijación de IgM (III.1.2.4.). No se ha observado en estos ensayos, sin embargo, estimulación de la unión de $Fc\gamma$ a PA en presencia de $F(ab')_2\gamma$, tal como se ha descrito en otro trabajo (Biguzzi, 1982).

En el mismo sentido pueden interpretarse los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la proteólisis parcial de células de *S. aureus* sobre su capacidad de unión de IgM , $F(ab')_2\gamma$, $Fc\gamma$ e IgG (III.2.4.), los cuales muestran que si bien la de $Fc\gamma$ es mucho más afectada que la de $F(ab')_2\gamma$, las estructuras receptoras no deben hallarse claramente separadas, ya que la diferencia observada no es lo suficientemente limpia como para sostener lo contrario. Hay que considerar, sin embargo, la limitación experimental que puede suponer el hecho de que la especificidad de los enzimas utilizados no fuera la más adecuada para determinar esta cuestión.

Con todo, no cabe duda de que se trata de sitios localizados en puntos distintos de la molécula de PA, como lo demuestra la mayor relación hallada entre los de unión de IgM y $F(ab')_2\gamma$ y los epitopos de PA, respecto de los de unión de $Fc\gamma$ (III.2.5.), de acuerdo con la descripción inicial de la reacción de coprecipitación entre $Fc\gamma$, PA y anticuerpos anti-PA (Kronvall y Williams, 1971), o con los trabajos de modificación química de aminoácidos de la PA esenciales en la interacción con la región $Fc\gamma$, como la Tyr (Sjoholm y col., 1972; Sjoholm y col., 1973), que no afectan su reactividad con regiones $F(ab')_2\gamma$ (Romagnani y col., 1982b).

La localización en la molécula de PA de estos sitios implicados en la reactividad alternativa, a través de regiones Fab de inmunoglobulinas, es por el momento una cuestión abierta, al carecerse, por ejemplo, de complejos cristalizados similares al que permitió la caracterización del sitio de unión de $Fc\gamma$, por el análisis de su patrón de difracción de rayos X (Deisenhofer y col., 1978). Puede decirse, no obstante, que probablemente se hallen también sobre los mismos dominios de la PA que tienen sitios de unión de $Fc\gamma$ (Sjodahl, 1977a; Deisenhofer y col., 1978), pues de encontrarse en la otra zona diferenciada de la PA, la región X, no habría resultado afectada la capacidad de unión de IgM o $F(ab')_2\gamma$ en la digestión de *S. aureus* con tripsina, ya que esa región de la molécula de PA permanece intacta sobre la pared celular tras ese tratamiento (Sjodahl, 1977a).

De hecho, existe evidencia indirecta de que los dominios homólogos de la PA tienen sitios de interacción con estructuras Fab, por la aglutinación observada en presencia del fragmento B de eritrocitos cubiertos de IgG humana, pero no cuando están cubiertos con IgG de conejo (Barnett-Foster y col., 1982), que a diferencia de la humana, no muestra reactividad tipo Fab (Inganas y col., 1980).

En el mismo sentido, podría ser interesante el estudio de un polipéptido producido por cepas de *S. hyicus*, el cual da reacciones de precipitación con IgG humana y con sueros anti-PA (Muller y col., 1981), pero su estructura, a juzgar por su movilidad electroforética y tamaño molecular, puede equivaler a uno de los dominios de homología de la PA, o unidad de la que podría haber surgido la actual molécula de *S. aureus*, por duplicación del gen primitivo correspondiente a tal dominio (Sjodahl, 1977b).

III.5.3. Receptor de proteína A de la IgM monoclonal Iz.

Para determinar la región de la molécula de IgM que tiene el sitio de unión de PA, se han examinado las reactividades de los fragmentos producidos a partir de una proteína monoclonal, la IgM Iz, por la conveniencia señalada en el apartado III.3.1..

Algunos estudios han asociado el receptor de PA de

IgM a estructuras de su región $(Fc)_5\mu$, en base a que este fragmento de la molécula, y no el $Fab\mu$, es retenido en columnas de PA-Sepharose y da reacción de coprecipitación (Grov, 1975a). Estos resultados, sin embargo, no se reproducen con otras proteínas monoclonales, que como la IgM se pierden su reactividad con PA sólo con tratamientos parcialmente desnaturalizantes (Harboe y Follin, 1974), ni coinciden con los obtenidos aquí con la IgM Iz.

Así, en ensayos de reactividad preliminares, por cromatografía de afinidad en PA-Sepharose, resulta que ninguno de los fragmentos preparados es retenido en la columna (III.3.2.-III.3.5.), sólo algunos de los precursores de $(Fc)_5\mu$ en la digestión de IgM, son fijados, precisamente los de mayor contenido en regiones $Fab\mu$ intactas, pudiendo deducirse de este conjunto de experimentos, la irrelevancia de la región $(Fc)_5\mu$ en la interacción, frente a la aparente relación entre la reactividad inicial y el mantenimiento de las regiones $Fab\mu$ de la IgM (III.3.3.).

Estos resultados, no obstante, se comprenden mejor a la vista de los datos de los ensayos de inhibición competitiva de la fijación de IgM Iz a PA (III.3.6.), los cuales muestran claramente cómo la región $Fab\mu$ lleva la estructura receptora de PA. Por otro lado, y como se apuntaba en los experimentos de cromatografía de afinidad, la avidez de la IgM por la PA, viene determinada por la naturaleza multiva-

lente de su molécula polimérica, apreciándose una progresiva disminución en la avidez de la interacción con el grado de despolimerización, representado en el paso IgM a IgM monómero o $F(ab')_2\mu$ a $Fab'\mu$ o $Fab\mu$ (tabla III.4.), motivo por el que carecen de capacidad de fijación a la columna de PA-Sepharose.

Esta relación entre multivalencia y avidez por la PA se conoce también en otras IgM monoclonales (Harboe y Folling, 1974; Howell-Saxton y Wettstein, 1978), en la interacción de la IgG humana policlonal a través de su región $Fab\gamma$ (III.2.2.) y en la de IgG de cabra, capaz de unirse a la PA cuando se encuentra agregada en inmunocomplejos (Langone, 1980).

Adicionalmente, varios tipos de radioensayos con subfragmentos de la región $Fab\mu$, como la inhibición competitiva de la fijación de IgM Iz a PA (III.3.8.) o de su reacción de coprecipitación (III.3.9.), en los que la cadena ligera es inactiva, o la inhibición de la fijación de IgM Iz a PA por anticuerpos contra el dominio V_H (III.3.10.), asocian a esta región de la IgM las estructuras de su receptor de PA.

III.5.4. Receptor de proteína A en los dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulinas.

Los resultados obtenidos con la IgM Iz pueden ex-

tenderse, asimismo, a las proteínas IgM policlonales, a partir de la evidencia indirecta obtenida en los ensayos de inhibición de fijación a *S. aureus* y de coprecipitación con PA y Fc γ , en presencia de anticuerpos anti-Fab μ (III.4.1.) o anti-V $_H$ (III.4.2.). Por otra parte, la generalización de estas conclusiones, que se hallan de acuerdo con la unión de algunos fragmentos F(ab') $_2\mu$ y Fv de IgM policlonaal a PA-Sepharose (Biguzzi, 1982), ayuda a descartar que en la interacción considerada de IgM y PA, estén implicados los mecanismos de reconocimiento de antígeno de la función anticorpal (III.3.8.), tal como ha sido descrito con anticuerpos de especificidad conocida, capaces de unir su antígeno y de unir PA a través de su región F(ab') $_2\gamma$ (Biguzzi, 1982).

Más interesante es que de la probable actividad anti-"framework" de los anticuerpos anti-V $_H$ que interfieren la interacción de IgM con PA, claramente apreciada en su reacción con IgG e IgA policlonales, así como con una IgE monoclonal (III.4.3.), surge una relación entre epitopos de las regiones V $_H$ y reactividad alternativa con PA del tipo Fab, que sugiere la localización del receptor de PA de estas inmunoglobulinas en los dominios variables de sus cadenas pesadas (III.4.4.), de acuerdo con los resultados obtenidos directamente con la IgM Iz.

De este modo, la presencia de un receptor de PA en los dominios V $_H$ de inmunoglobulinas, permite contemplar

los resultados acerca de la interacción inmunoglobulinas-PA, desde una perspectiva integradora, pudiendo entenderse la irrelevancia del isotipo de cadena ligera o de cadena pesada en la naturaleza de la reactividad, precipitante o inhibidora de precipitación, de IgG humana de mieloma (Kronvall y Williams, 1969; Myhre y Kronvall, 1980b; Inganas y Johansson, 1981), o en la sola determinación de la reactividad o no reactividad con PA de IgA e IgM monoclonales humanas (Harboe y Folling, 1974; Biewenga y col., 1982). Así, aunque en algún momento llegaron a asociarse las proteínas IgA2 con las formas de IgA que unen PA (Saltvedt y Harboe, 1976; Virella y col., 1978), posteriormente se describieron proteínas IgA1, tanto monoclonales (Brunda y col., 1977) como policlonales (Van Kamp, 1979), que también reaccionan con PA. Del mismo modo, no ha podido sostenerse la división de la IgM en dos subclases de acuerdo con la diferente reactividad de las proteínas consideradas (Harboe y Folling, 1974; Inganas, 1981).

Por lo que se refiere a la IgG, la no reactividad inicialmente atribuida a la IgG3 (Kronvall y Williams, 1969), parece estar relacionada con la sustitución de aminoácidos en la secuencia del Fc que determina la unión a PA de las IgG reactivas (Recht y col., 1981; tabla III.5.), siendo posible, incluso, que algunas de las IgG3 policlonales que se unen a PA-Sepharose (Skvaril, 1976; Van Kamp, 1979), lo hagan a través de receptores de sus dominios V_H .

Verdaderamente, las estructuras que median la reactividad con PA del tipo Fc, parecen encontrarse sólo en proteínas IgG (Inganas, 1981), mientras que la reactividad tipo Fab es común a todas las clases de inmunoglobulinas policlonales: IgG, IgA e IgM (III.4.4.), IgE (Inganas y col., 1980) y monoclonales (Inganas, 1981). Esto podría constituir una más de las distintas capacidades efectoras de las clases de inmunoglobulinas relacionada con las diferencias de sus cadenas pesadas.

Así, además del efecto que el distinto patrón de glicosilación de las regiones Fc de las otras clases de inmunoglobulinas respecto del de Fc γ (Toraño y col., 1977) pudiera tener sobre el acceso de la PA, cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc correspondientes a los tres segmentos del Fc γ que establecen contacto con la PA (Deisenhofer y col., 1978), puede advertirse cómo únicamente se hallan representadas idénticamente, o casi, en las distintas subclases de IgG (tabla III.5.), en tanto que las de IgA1, IgA2, IgE, IgM e IgD, dispuestas del modo en que puede conseguirse máxima homología en la totalidad de la cadena pesada, aparecen completamente diferentes (tabla III.5.). Sin embargo, proteínas IgG reactivas con PA de otros mamíferos, como cobayo y ratón, conservan la mayoría de la secuencia de esas zonas de contacto (Ricardo y col., 1981).

Tabla III.5. SECUENCIA DE LAS REGIONES DE CONTACTO Fc γ -PA
Y LAS DE SEGMENTOS HOMOLOGOS DE OTRAS CLASES
DE INMUNOGLOBULINAS.

	N252	N308	N433
γ_1	Met Ile Ser	Val Leu His Gln Asn	His Asn His Tyr
γ_2	+ Ile Ser	Val Val His Gln Asp	His Asn His Tyr
γ_3	+ Ile Ser	Val Leu His Gln Asp	His Asn Arg Tyr
γ_4	Met Ile Ser	Val Leu His Glx Asx	His Asx His Tyr
α_1	§ Leu Gly	Gly Cys Ala Gln Pro	Pro Leu Ala Phe
α_2	§ Leu Gly	Gly Cys Ala Glx Pro	Pro Leu Ala Phe
μ	§ Leu Thr	Ile Cys Gln Asp Asx	Pro Asn Arg Val
ϵ	§ Ile Arg	Val Gly Thr Arg Asx	Ser Pro Ser Gln
δ	§ Leu Arg	Leu Pro Arg Ser Leu	Ser § Arg §

Comparación de las secuencias de aminoácidos de los tres segmentos N252-254, N308-312 y N433-436 de la región Fc que interaccionan con la PA (Deisenhofer y col., 1978), correspondientes a las subclases de IgG humana y a los segmentos equivalentes de las cadenas pesadas de las restantes clases de inmunoglobulinas que resultan de la alineación de las secuencias que permite una simetría de dominios y homología máximas. Las secuencias proceden de: Low y col., 1976 (γ_1 , μ , ϵ y α_1), Connell y col., 1979 (γ_2), Wolfenstein-Toddell y col., 1976 (γ_3), Pink y col., 1970 (γ_4), Toraño y Putnam, 1978 (α_2) y Takahashi y col., 1982 (δ). El alineamiento base es de Low y col., 1976. El último segmento δ es de difícil asignación, por la baja homología de su extremo C-terminal. § y +, indican huecos del alineamiento y posición no determinada, respectivamente.

Por otro lado, además de no llevar en su región F_c estructuras equivalentes a las de F_{cy} que unen PA, resulta difícil imaginar qué variación deben presentar las inmunoglobulinas no IgG en las regiones constantes de sus cadenas pesadas, capaz de explicar la variabilidad observada en su reactividad con la PA (Harboe y Follin, 1974; Biewenga y col., 1982). Esta característica, junto con que el mecanismo de interacción sea común a todas las clases de inmunoglobulinas, incluida la IgG (III.4.4.; Inganas, 1981), son propiedades de la reactividad tipo Fab, que pueden explicarse fiablemente a partir de la existencia en los dominios V_H de un receptor de PA.

Hay que tener en cuenta, que todas las clases de inmunoglobulinas utilizan el mismo conjunto de genes V_H (Tonegawa, 1983) y que, si bien dan lugar a gran número de secuencias para el dominio V_H , su estructura tridimensional adopta una configuración definida, capaz de albergar esa variabilidad en un modelo de pliegue polipeptídico determinado por la disposición en segmentos de los aminoácidos más invariantes, o regiones "framework", del dominio (Davies y Metzger, 1983). Esto, como las homologías del dominio V_H de inmunoglobulinas del mismo subgrupo V_H , superiores a las de sus regiones C_H si son de distinta clase (Putnam, 1977a), es compatible con la manifestación de reactividades tipo Fab por las distintas clases de inmunoglobulinas a través de estructuras de sus dominios V_H .

Con todo, la heterogeneidad observada en esta reactividad, puede estar asociada con la variabilidad estructural inherente a los dominios V_H , aunque se hallen pendientes estudios con proteínas de distintos subgrupos V_H para tratar de averiguar si hubiese alguna relación con su reactividad con PA.

Que las inmunoglobulinas con reactividad tipo Fab de otros mamíferos lleven, asimismo, epítopos reconocibles por anticuerpos contra regiones V_H de inmunoglobulinas humanas (III.4.5.), constituye un apoyo adicional a la presencia de receptores de PA en los dominios V_H .

De hecho, el análisis de las secuencias de nucleótidos de genes V_H , permite establecer la existencia de grandes homologías entre los genes del mismo subgrupo de distintos animales: las homologías halladas entre genes V_H de mamíferos, humano y ratón (Rechavi y col., 1983) o humano y conejo (Bernstein y col., 1982), se extiende incluso a especies evolutivamente distantes, como los primitivos insectívoros, aves y reptiles (Litman y col., 1982). Así, el 70% de los nucleótidos de un gen V_H de *Caiman* son idénticos a los del gen de ratón utilizado como prueba en su aislamiento, y la homología con genes V_H humanos parece aún mayor (Litman y col., 1983), hallándose el mayor número de nucleótidos idénticos en las regiones "framework", de acuerdo con la selección conservativa a que se encuentran sometidas, en

una mayor presión evolutiva que la que actúa sobre otras áreas del dominio variable con libertad adaptativa, como las regiones CDR (Loh y col., 1983).

Ya que el dominio V_H , como la región Fv, conserva la reactividad con PA de las regiones Fab, como se ha determinado para la IgM Iz (III.10.), es posible que este receptor de PA esté definido sólo por estructuras del dominio variable, a diferencia del de la región Fc de IgG, definido por segmentos de la zona interdominios C γ 2-C γ 3 (Deisenhofer y col., 1978). Esto, junto con el hecho conocido de que las láminas β antiparalelas que constituyen ambos dominios variables, se hallen asociadas a través de su capa de 5 segmentos (figura I.4.), permite especular con que el receptor de PA estuviese definido por secuencias de las regiones "framework" 1 y/o 3, que forman las hojas externas de la lámina (figura III.66).

Por otro lado, esta reactividad a través de los dominios V_H , probablemente esté relacionada con los fenómenos de activación de linfocitos por PA (apartado I.6.1.). Así, para las células B se ha demostrado que la proliferación inducida por *S. aureus*, se debe a su interacción con las inmunoglobulinas de su membrana, a través de estructuras de sus regiones Fab (Romagnani y col., 1981b), lo que permite comprender esta actividad en poblaciones celulares constituidas mayoritariamente por linfocitos con IgM e IgD en superficie, y que incluso en la estimulación de linfoci-

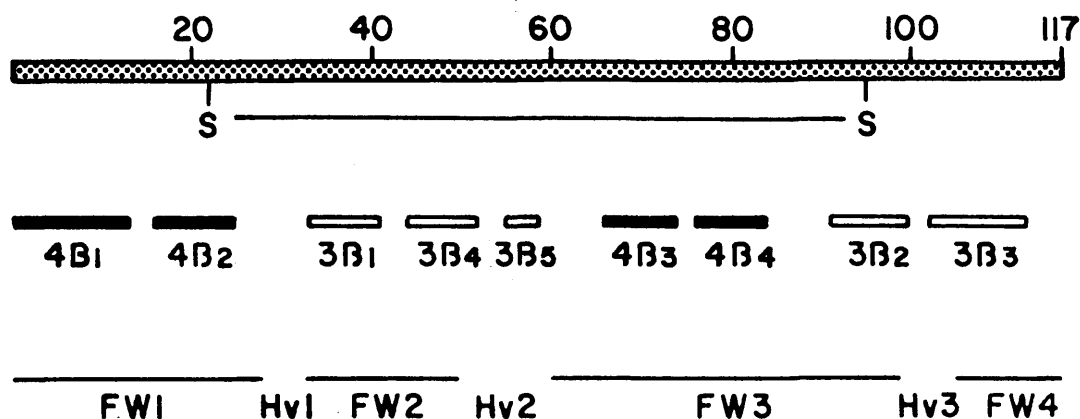


Figura III.66. Diagrama esquematizado de un dominio V_H mostrando, en el centro, los segmentos de las hojas externa, negros, e interna, blancos, de la lámina β antiparalela en que se dispone su cadena polipeptídica, identificados según una nomenclatura que hace referencia a su posición en la hoja de 4 o de 3 segmentos (5 en regiones V) del pliegue de inmunoglobulinas, y su orden en la secuencia de aminoácidos (Amzel y Poljak, 1979). Esta disposición y la de los segmentos "framework", FW, y regiones hipervariables, Hv, corresponden al dominio V_H de la IgG humana New, arriba (Poljak y col., 1977; Saul y col., 1978).

tos con IgG, no se hallen implicados los sitios de unión de PA del fragmento Fc γ (Sjodahl y Moller, 1979).

Que anticuerpos anti-F(ab') $_2\gamma$ o fragmentos F(ab') $_2\gamma$ inhiban completamente la formación de rosetas entre eritrocitos cubiertos de PA y linfocitos no T, así como su proliferación en presencia de *S. aureus*, tanto de individuos normales (Romagnani y col., 1981b), como de pacientes con leucemia linfocítica crónica (Romagnani y col., 1982a), se halla de acuerdo con que se trate de actividades mediadas a través del receptor de PA en las regiones V $_H$ de las inmunoglobulinas de membrana.

En la estimulación de células T por PA, se halla pendiente la identificación de la estructura reconocida en estas células (Nakao y col., 1980) y la eventual relación con su receptor de antígeno. El hecho de que se puedan detectar en su superficie epitopos de regiones V $_H$ no idiotípicos, e incluso que puedan perturbarse funciones celulares características de células T por anticuerpos contra esos epitopos (Forre y col., 1982), ha apuntado a que los sitios de unión de antígeno de ese receptor podrían estar definidos, también, por los genes de las regiones V $_H$ de inmunoglobulinas (Marchalonis, 1982), en estructuras que por ello podrían ser reconocidas por la PA.

Sin embargo, no se han hallado mRNA con secuencias

homólogas de las de genes V_H en células T de muy diversa procedencia: linfomas, linfocitos periféricos, hibridomas, etc., utilizando pruebas de DNA conteniendo genes V_H conocidos (Kemp y col., 1982), ni se han detectado translocaciones en los genes V_H de células T productoras de factores específicos de antígeno con un idiotipo común al de anticuerpos contra ese mismo antígeno (Nakahishi y col., 1982; Kraig y col., 1983), todo lo cual sugiere que las células T probablemente no transcriben ninguno de los segmentos génicos del repertorio V_H de las células B (Kronenberg y col., 1983).

La proliferación de células T humanas en presencia de PA, no obstante, es inhibida por IgG policlonal y sus fragmentos $F(ab')_2\gamma$ (Sumiya y col., 1980), habiéndose descrito incluso la unión de receptores de antígeno de membranas de células T a PA insolubilizada en agarosa a alta densidad (Binz y col., 1980).

Sin embargo, el receptor de antígeno de células T (T_i) se ha identificado recientemente como un heterodímero de 90000 de peso molecular, compuesto por dos subunidades α y β de ≈ 50000 y 43000 de peso molecular, respectivamente, unidas por un puente disulfuro (Meuer y col., 1983a,b), asociado no covalentemente a una molécula de 20-25000 de peso molecular, el componente T3, que es similar en todas las células T maduras (Reinherz y col., 1980), a diferencia de las T_i , que presentan el polimorfismo esperado para la región variable del recep-

tor de antígeno (Acuto y col., 1983). Esta molécula Ti parece no interaccionar con la PA, tal como indirectamente puede deducirse de los controles de los experimentos de inmunoprecipitación con PA-Sepharose o *S. aureus* con PA (Acuto y col., 1983; Reinherz y col., 1983).

Por todo ello, aunque en la estimulación de células T por PA pudieran hallarse implicados los sitios relacionados con su reactividad alternativa, tipo Fab, se trata de un fenómeno mucho menos conocido que el correspondiente de estimulación de células B.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos del conjunto de la labor experimental efectuada acerca de la interacción de inmunoglobulinas humanas con la proteína A de *S. aureus*, puede resumirse en las siguientes conclusiones:

- 1.- La capacidad de fijación de la IgM policlonal a columnas de PA-Sepharose permite, en combinación con otras técnicas cromatográficas, como la filtración en gel, su aislamiento a partir de suero normal, en un procedimiento rápido y de buen rendimiento. Esto es, además, clara evidencia de que otras clases de inmunoglobulinas, y no sólo las IgG, interaccionan con la proteína A.
- 2.- La pequeña cantidad de IgM e IgA presente en la fracción de suero retenida en PA-Sepharose se debe, en buena parte, a su menor concentración en suero respecto de la de IgG, inmunoglobulina mayoritaria en aquella fracción, ya que en estudios de fijación cuantitativa la afinidad de la IgM por la proteína A resulta mayor que la de la IgG (por ejemplo, en la unión a células de *S. aureus*, las K_a respectivas son 1×10^9 l/mol y 1.65×10^8 l/mol).
- 3.- La interacción con proteína A de la IgM policlonal es del tipo alternativo, pues resulta inhibida por fragmentos $F(ab')_2$ de IgG pero no por los Fc.
- 4.- Las estructuras de la proteína A que median ambos tipos de reactividades de inmunoglobulinas, alternativa, relacionada con sus fragmentos Fab, y clásica, con el Fcγ,

determinan sitios de interacción distintos, permitiendo la formación de complejos en los que la proteína A tiene unidas simultáneamente moléculas de IgM o Fab y de Fcγ. No obstante, las débiles inhibiciones recíprocas observadas en la fijación de unos y otros fragmentos de IgG a células de *S. aureus*, sugieren que tales sitios no son totalmente independientes.

- 5.- La reactividad con proteína A del tipo alternativo muestra una estrecha relación con la valencia de la molécula considerada, de modo que a mayor contenido en regiones Fab más fuerte es la interacción observada.
- 6.- La reacción de precipitación directa con proteína A está restringida a inmunoglobulinas que manifiestan ambos tipos de reactividades, por lo que las IgG con regiones Fab no reactivas con proteína A no dan reacciones de precipitación, aunque sí de coprecipitación. Del mismo modo, las IgM, sólo con reactividad de tipo alternativo, dan reacciones de coprecipitación; sin embargo, y probablemente a causa de su multivalencia, en condiciones particulares dan reacciones de precipitación directa.
- 7.- En la localización del sitio de interacción de la IgM con proteína A, efectuada directamente con una proteína monoclonal, el dominio V_H es la región más pequeña de su molécula que contiene las estructuras a través de las que se une a la proteína A.

- 8.- Determinantes antigénicos de la IgM policlonal reactiva con proteína A, comunes con otros del dominio V_H de una monoclonal de reactividad conocida a través de esa región de su molécula, se hallan asociados al sitio de interacción con proteína A, de modo que, probablemente, todas las moléculas de IgM que interaccionan con proteína A llevan también en sus dominios V_H el sitio de unión.
- 9.- Estos determinantes antigénicos, que deben localizarse en los segmentos "framework" o menos invariantes del dominio V_H , ya que se encuentran en regiones V_H de IgG policlonal, y también en inmunoglobulinas IgA e IgE, están relacionados con la reactividad de tipo alternativo, hallándose fundamentalmente en todas las inmunoglobulinas que la presentan, antes que en las que no o en las que tienen sitios reactivos sólo en su región Fc .
- 10.- La reactividad alternativa de inmunoglobulinas está mediada por estructuras de sus dominios V_H , pudiendo atribuirse la heterogeneidad de dicha interacción a la variabilidad estructural de esa región de las inmunoglobulinas y, por lo mismo, la independencia del isotipo de cadena ligera o pesada característica de la reactividad alternativa.
- 11.- De igual modo que el sitio de unión a proteína A de la región $Fc\gamma$, el de interacción a través de los dominios V_H aparece evolutivamente conservado, encontrándose en

las inmunoglobulinas de mamíferos con reactividad alternativa, pero no en las de los que no la presentan, estructuras que son reconocidas por los mismos anticuerpos contra segmentos "framework" humanos que interfieren la interacción de inmunoglobulinas humanas con la proteína A.

BIBLIOGRAFIA

- Acuto, O., Meuer, S.C., Hodgson, J.C., Schlossman, S.F. y Reinherz, E.L. (1983) *J. Exp. Med.* 158, 1368-1373.
- Amzel, L.M., Poljak, R.J., Saul, F., Varga, J.M. y Richards, F.F. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4298-4302.
- Amzel, L.M. y Poljak, R.J. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 961-997.
- Arnott, S., Fulmar, A., Scott, W.E., Dea, I.C.M., Moorhouse, R y Rees, D.A. (1974) *J. Mol. Biol.* 90, 269-284.
- Axen, R., Porath, J. y Ernback, S. (1967) *Nature* 214, 1302-1304.
- Baltimore, D. (1981) *Cell* 24, 592-594.
- Banerji, J., Rusconi, S. y Schaffner, W. (1981) *Cell* 27, 299-308.
- Banerji, J., Olson, L. y Schaffner, W. (1983) *Cell* 33, 729-740.
- Barlow, G.H. y Margoliash, E. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 1473-1478.
- Barnett Foster, D.E., Sjoquist, J. y Painter, R.H. (1982) *Mol. Immunol.* 19, 407-412.
- Batley, J., Max, E.E., McBrich, W.O., Swan, D. y Leder, P. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5956-5960.
- Bennell, M.A. y Watson, D.L. (1980) *Microbiol. Immunol.* 24, 871-878.
- Ben-Neriah, Y., Wuilmart, C., Lonai, P. y Givol, D. (1978) *Eur. J. Immunol.* 8, 797-801.
- Bennich, H. y Turner, M.W. (1969) *Biochem. Biophys. Acta* 175, 388-395.
- Bennich, H. y von Bahr-Lindstrom, H. (1974) *Prog. Immun. II*, 49-58.
- Bentley, D.L. y Rabbits, T.H. (1983) *Cell* 32, 181-189.
- Bernstein, E.K., Reddy, E.P., Alexander, C.B. y Meige, R.G. (1982) *Nature* 300, 74-76.
- Biewenga, J., Daus, F., Moderman, M.L. y Bruin, G.M.M.L. (1982) *Immunol. Commun.* 11, 189-200.

- Biguzzi, S. (1982) *Scand. J. Immunol.* 15, 605-618.
- Binz, H., Frischkecht, H y Wigzell, H. (1980) en *Immunology of the eye. Workshop I. Immunogenetics and transplantaion inmunity*. Steinberg, G.M., Gery, I. y Nussenblatt, R.B. *Sp. Supp. Immunology Abstracts* pp. 131-138.
- Bjork, I., Petterson, B.-A. y Sjoquist, J. (1972) *Eur. J. Biochem.* 29, 579-584.
- Blobel, G. y Bobberstein, B (1975) *J. Cell. Biol.* 67, 835-851.
- Bornstein, N., Tissot, D., Flandrois, J.-P. y Fleurette, V. (1980) *Ann. Microbiol. (Paris)* 131A, 285-290.
- Brandtzaeg, P. (1981) *Clin. Exp. Immunol.* 44, 221-232.
- Brunda, M.J., Nindem, P., Grey, H.M. (1979) *J. Immunol.* 123, 1457-1461.
- Brunhouse, R. y Cebra, J.J. (1979) *Mol. Immunol.* 16, 907-917.
- Cann, G.M., Zaritsky, A. y Koshland, E.M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6656-6660.
- Capra, J.D. y Kehoe, J.M. (1975) *Adv. Immunol.* 20, 1-40.
- Catalona, W.J., Ratcliff, T.L. y McCool, R.E. (1981) *Nature* 291, 77-79.
- Clark, C., Berenson, J., Gerverman, J., Boyer, P.D., Crews, S., Siu, G. y Calame, K. (1982) *Nucleic Acid Res.* 10, 7731-7749.
- Clevinger, B., Schilling, J., Hood, L. y Davie, J. M. (1980) *J. Exp. Med.* 151, 1059-1070.
- Coe, J.E., Coe, P.R. y Ross, M.J. (1981) *Mol. Immunol.* 18, 1007-1012.
- Coffman, R.L. y Cohn, M.J. (1977) *J. Immunol.* 118, 1806-1815.
- Connell, G.E. y Porter, R.R. (1971) *Biochem. J.* 124, 53p
- Connell, G.E., Parr, D.M. y Hofman, T. (1979) *Can. J. Biochem.* 57, 758-767.

- Cory, S., Tyler, B.M. y Adams, J.M. (1981) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 103-116.
- Cramer, H. (1972) en *Elementos de la teoría de probabilidades y algunas de sus aplicaciones*, 6 edn., pp. 214-242, Aguilar, Madrid.
- Cuatrecasas, P. y Hollemberg, M.D. (1975) *Adv. Prot. Chem.* 28, 252-432.
- Chalon, M.P., Milne, R.W. y Vaerman, J.P. (1979) *Scand. J. Immunol.* 9, 359-364.
- Chaplin, H., Cohen, S. y Press, E.M. (1965) *Biochem. J.* 95, 256-261.
- Chen, J.P., Reichlin, M y Tomassi, Jr., J.B. (1969) *Biochemistry* 8, 2246-2254.
- Davies, D.R. y Metzger, H. (1983) *Ann. Rev. Immunol.* 1, 87-117.
- Davis, B.J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Deisenhofer, J., Jones, T.A., y Huber, R. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 975-985.
- Deisenhofer, J. (1981) *Biochemistry* 20, 3370-3378.
- Delacroix, D. y Vaerman, J.P. (1979) *Mol. Immunol.* 16, 837-840.
- DePreval, C., Pink, J.R.L. y Milstein, C. (1970) *Nature* 228, 930-932.
- Doran, J.E. y Raynor, R.H. (1981) *Infect. Immun.* 33, 683-689.
- Duggleby, J.C. y Jones, S.A. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11, 3065-3076.
- Duhamel, R.C., Schur, P.H., Brendel, K. y Meezan, E. (1979) *J. Immunol. Meth.* 31, 211-217.
- Dunker, A.K. y Kenyon, A.J. (1976) *Biochem. J.* 153, 191-197.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K. y Hood, L. (1980) *Cell* 19, 981-992.

- Edelman, G. (1970) *Biochemistry* 9, 3197-3204.
- Edmunson, A.B., Ely, K.R., Abola, R.R., Schiffer, M. y Paniaquiatopoulos, N. (1975) *Biochemistry* 14, 4943-4952.
- Eisen, H.N. (1980a) en *Microbiology*, 3 edn., pp. 338-380, Harper y Row Publishers, Inc., Maryland, USA.
- Eisen, H.N. (1980b) en *Microbiology*, 3 edn., pp. 420-450, Harper y Row Publishers, Inc., Maryland, USA.
- Elder, J.H., Pickett, R.A., Hampton, J. y Lerner, R.A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6510-6515.
- Eldridge, J. (1964) *Nucleonics* 22, 56-62.
- Elliot, Jr., B.W., Eisen, H.N. y Steiner, L.A. (1982) *Nature* 299, 559-561.
- Ellison, J. y Hood, L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1984-1988.
- Endresen, C. y Grov, A. (1976) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C* 84, 397-402.
- Endresen, C. (1979) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C* 87, 185-189.
- Erntell, M., Myhre, E.B. y Kronvall, G. (1983) *Scand. J. Immunol*, 201-209.
- Ey, P.L., Prowse, J.J. y Jenkin, C.R. (1978) *Immunochemistry* 15, 429-436.
- Falkoff, R.J.M., Zhu, L.P. y Fauci, A.S. (1982) *J. Immunol.* 129, 97-102.
- Feinstein, A., Munn, E.A. y Richardson, N.E. (1971) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 190, 104-112.
- Field, P.R., Shanker, J. y Murphy, A.M. (1980) *J. Immunol. Meth.* 32, 59-70.
- Fleishmann, J.B., Pain, R.H. y Porter, R.R. (1961) *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* 1, 174-181.

- Flanegan, J.G. y Rabbits, T.H. (1982) *Nature* 300, 709-713.
- Flandrois, J.-P., Fleurette, J. y Eyraud, F. (1975) *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 129B, 57-67.
- Fleischman, J.B., Pain, R.H. y Porter, R.R. (1961) *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* 1, 174-181.
- FMC Corporation. Marine Colloids Division (1982) *The Agarose Monograph*, Rockland, Maine, USA.
- Forsgren, A. y Sjoquist, J. (1966) *J. Immunol.* 97, 822-827.
- Forsgren, A. y Sjoquist, J. (1967) *J. Immunol.* 99, 19-24.
- Forsgren, A. (1969) *Acta path. microbiol. Scand.* 75, 481-490.
- Forsgren, A. y Sjoquist, J. (1969) *Acta path. microbiol. Scand.* 75, 466-480.
- Forsgren, A. (1970) *Infect. Immun.* 2, 672-673.
- Forsgren, A. y Quie, P.G. (1974) *J. Immunol.* 112, 1177-1180.
- Forsgren, A. Svedjelund, A. y Wigzell, H. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 207-212.
- Forsgren, A. y Grubb, A.O. (1979) *J. Immunol.* 122, 1468-1472.
- Forre, O., Michaelsen, T. y Natvig, J.B. (1982) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 22, 436-441.
- Fraker, P.J. y Speck, Jr., J.C. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849-857.
- Fuchs, S. y Sela, M. (1978) en *Handbook of Experimental Immunology*, 3 edn., (Weir, D.M., ed.) pp. 10.1-10.6, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
- García Pardo, A., Lamm, M.E., Plaut, A.G. y Frangione, B. (1979) *Mol. Immunol.* 16, 477-482.
- García Pardo, A., Lamm, M.E., Plaut, A.G. y Frangione, B. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11734-11738.

- Gearhart, P.J. y Bogenhagem, D.F. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3439-3443.
- Ghose, A. C. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 1144-1150.
- Giles, R.C., Klapper, D.G. y Clem, L.W. (1983) *Mol. Immunol.* 20, 737-744.
- Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T. y Tonegawa, S. (1983) *Cell* 33, 717-728.
- Givol, D., Zakut, R., Effron, K., Rechavi, G., Ram, D. y Cohen, J.B. (1981) *Nature* 292, 426-430.
- Goding, J.W. (1978) *J. Immunol. Meth.* 20, 241-253.
- Goudswaard, J., Van der Donk, J.A., Noordzij, A., Van Dam, R.H. y Vaerman, J.P. (1978) *Scand. J. Immunol.* 8, 21-28.
- Grabar, P. y Williams, C.A. (1953) *Biochem. Biophys. Acta* 10, 193-194.
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M. y Glover, J.J. (1963) *Biochem. J.* 89, 114-123.
- Grov, A., Myklestad, B. y Oeding, P. (1964) *Acta path. microbiol. Scandinav.* 61, 588-596.
- Grov, A. (1975a) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C* 83, 173-176.
- Grov, A. (1975b) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C* 83, 325-327.
- Grov, A. (1976) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C* 84, 71-72.
- Grov, A. y Endresen, C. (1976) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C* 84, 333-336.
- Grubb, A., Grubb, R., Christenssen, P. y Schalen, C. (1982) *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 67, 369-376.
- Gustafson, G.T., Stalenheim, G., Forsgren, A. y Sjoquist, J. (1968) *J. Immunol.* 53, 53-59.
- Haake, D.A., Franklin, E.C. y Frangione, B. (1982) *J. Immunol.* 129, 190-192.

- Harboe, M. y Folling, I. (1974) *Scand. J. Immunol.* 3, 471-482.
- Heide, K. y Schwick, H.G. (1978) en *Handbook of Experimental Immunology* 3 edn. (Weir, D.M.) pp. 7.1-7.11. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
- Heczko, P.B., Grov, A. y Oeding, P. (1973) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. B* 81, 731-740.
- Helgeland, S.M., Naess, R.R. y Grov, A. (1975) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. C* 83, 15-18.
- Herbert, W.J. (1968) *Immunology* 14, 301-308.
- Hester, R.B., Mole, J.E. y Schrohenloher, R.E. (1975) *J. Immunol.* 114, 486-491.
- Hiernaux, J. y Bona, C.A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1616-1620.
- Hieter, P.A., Holhs, G.F., Korsmeyer, S., Waldman, T. y Leder, P. (1981) *Nature* 294, 536-540.
- Hieter, P.A., Maizel, J.V. y Leder, P. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1516-1522.
- Hill, R.L., Delaney, R., Fellows, R.E. y Lebovitz, H.E. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 1762-1769.
- Hjelm, H., Hjelm, K. y Sjoquist, J. (1972) *FEBS Lett.* 28, 73-76.
- Hjerten, S. (1962) *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* 1, 147-151.
- Holowka, D.A. y Cathou, R.E. (1976) *Biochemistry* 15, 3379-3384.
- Honjo, T. (1983) *Ann. Rev. Immunol.* 1, 495-528.
- Howell-Saxton, E. y Wettstein, F.D. (1978) *J. Immunol.* 121, 1334-1340.
- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M. y Palm, W. (1976) *Nature* 264, 415-420.
- Hubbard, A.L. y Cohn, Z.A. (1975) *J. Cell. Biol.* 64, 438-460.

- Hudson, L. y Hay, F.C. (1976) en *Practical Immunology*, 1 edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
- Hunter, W.M. (1978) en *Handbook of Experimental Immunology*, 3 edn. (Weir, D.M.) pp.14.1-14.40, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
- Inganas, M., Johansson, S.G.O. y Bennich, H.H. (1980) *Scand. J. Immunol.* 12, 23-31.
- Inganas, M. (1981) *Scand. J. Immunol.* 13, 343-352.
- Inganas, M. y Johansson, S.G.O. (1981) *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 65, 91-101.
- Jaton, J.-C. (1976) *Biochem. J.* 157, 449-454.
- Jensen, K. (1958) *Acta path. microbiol. Scandinav.* 44, 421-428.
- Jensenius, J.C., Johnston, A.P., Crone, M. y Andersen, I. (1982a) *Mol. Immunol.* 19, 571-577.
- Jensenius, J.C., Andersen I., Crone, M. y Koch, C. (1982b) *Mol. Immunol.* 19, 801-810.
- Jensenius, J.C. y Williams, A.F. (1982) *Nature* 300, 583-588.
- Johansen, A.S., Steensgard, J. y Jacobsen, C. (1980) *Immunology* 41, 695-704.
- Kabat, E.A. y Mayer, M.M. (1961) en *Experimental Immunochemistry*, edn., pp. 22-96, Charles C. Thomas Publisher, Illinois, Michigan, USA.
- Karush, F. (1978) en *Comprehensive Immunology. V. Immunoglobulins* (Litman, G. y Good, R., ed.) pp. 85-112, Plenum Press New York, New York, USA.
- Kataoka, T., Kawakami, T., Takahashi, N. y Honjo, T. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 919-923.
- Kataoka, T., Nikaido, T., Miyata, T., Moriwaki, K. y Honjo, T. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 277-285.

- Kemp, D.J., Adams, J.M., Mottram, P.L., Thomas, W.R., Walker, I.D. y Miller, J.F.P. (1982) *J. Exp. Med.* 156, 1848-1853.
- Kemp, D.J., Morahan, G., Cowman, A.F. y Harris, A.W. (1983) *Nature* 301, 84-86.
- Kessler, S.W. (1975) *J. Immunol.* 115, 1617-1624.
- Kessler, S.W. (1976) *J. Immunol.* 117, 1482-1490.
- Kishimoto, T., Onoue, K. y Yamamura, Y. (1968) *J. Immunol.* 100, 1032-1040.
- Kohler, W. y Prokop, O. (1978) *Nature* 271, 373-373.
- Kohno, Y., Berkower, I., Minna, J. y Berzofsky, J.A. (1982) *J. Immunol.* 128, 1742-1748.
- Koshland, M.E. (1975) *Adv. Immunol.* 20, 41-69.
- Kraig, E., Kronenberg, M., Kapp, J.A., Pierce, C.W., Abruzzini, A.F., Sorensen, C.M., Samuelson, L.E., Schwartz, R.H. y Hood, L. (1983) *J. Exp. Med.* 158, 192-209.
- Kronenberg, M., Kraig, E., Siu, G., Kapp, J.A., Marrack, P., Pierce, C.W. y Hood, L.E. (1983) *J. Exp. Med.* 158, 210-227.
- Krohn, K.A., Knight, L.C., Harwig, J.F. y Welch, M.J. (1977) *Biochem. Biophys. Acta* 490, 497-505.
- Kronvall, G. (1967) *Acta path. microbiol. Scandinav.* 69, 619-621.
- Kronvall, G. y Williams, Jr., R.C. (1969) *J. Immunol.* 103, 828-833.
- Kronvall, G. y Frommell, D. (1970) *Immunochemistry* 7, 124-127.
- Kronvall, G., Seal, U.S., Finstad, J. y Williams, Jr., R.C. (1970a) *J. Immunol.* 104, 140-147.
- Kronvall, G., Quie, P.G. y Williams, Jr., R.C. (1970b) *J. Immunol.* 104, 273-278.

- Kronvall, G., Grey, H.M. y Williams, Jr., R.C. (1970c)
J. Immunol. 105, 1116-1123.
- Kronvall, G., Messner, R.P. y Williams, Jr., R.C. (1970d)
J. Immunol. 105, 1353-1359.
- Kronvall, G., Dossett, J.H., Quie, P.G. y Williams, Jr., R.C.
(1971) *Infect. Immun.* 3, 10-15.
- Kronvall, G. y Williams, Jr., R.C. (1971) *Immunochemistry*
8, 577-580.
- Kronvall, G., Holmberg, O. y Ripa, T. (1972) *Acta path.
microbiol. Scand. Sect. B* 80B, 735-742.
- Kronvall, G., Seal, U.S., Svensson, S. y Williams, Jr., R.C.
(1974) *Acta pathol. microbiol. Scand. Sect. B* 82, 12-18.
- Kronvall, G., Myhre, E.B., Bjork, L. y Berggard, I. (1978)
Infect. Immun. 22, 136-142.
- Kronvall, G., Shonbeck, C. y Myhre, E.B. (1979) *Acta path.
microbiol. Scand. Sect. B* 87, 303-310.
- Kubagawa, H., Mayumi, M., Kearney, J.F. y Cooper, M.O. (1982)
J. Exp. Med. 156, 1010-1024.
- Lachica, R.V.F., Genigeorgis, C.A. y Hoeprich, P.D. (1979)
J. Clin. Microbiol. 5, 752-753.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Lancet, D., Isenman, D., Sjodahl, J., Sjoquist, J. y Pecht, I.
(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 608-614.
- Langone, J.J. (1978) *J. Immunol. Meth.* 24, 269-285.
- Langone, J.J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 473-479.
- Langone, J.J. (1982) *Adv. Immunol.* 32, 157-252.
- Laurell, C.V. (1972) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29,
Suppl. 124-131.
- Leive, L.L. y Davis, B.D. (1980) en *Microbiology*, 3 edn.,
pp. 73-110, Harper y Row Publishers, Inc., Maryland, USA.

- Lin, L.C. y Putnam, F.W. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2949-2953.
- Lin, L.C. y Putnam, F.W. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6572-6576.
- Lind, I. (1974) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. B* 82, 821-828.
- Lindmark, R., Movitz, J. y Sjoquist, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 74, 623-628.
- Lindmark, R., Biriell, C. y Sjoquist, J. (1981) *Scand. J. Immunol.* 14, 409-415.
- Lindmark, R. (1982) *Mol. Immunol.* 19, 957-959.
- Lipsky, P.E. (1980) *J. Immunol.* 125, 155-162.
- Litman, G.W., Berger, L. y Jahn, C.L. (1982) *Nucleic Acid Res.* 10, 3371-3380.
- Litman, G.W., Berger, L., Murphy, K., Litman, R., Hinds, K., Jahn, C.L. y Ericsson, B.W. (1983) *Nature* 303, 349-352.
- Loh, D.Y., Bothwell, A.L.M., White-Scharff, M.E., Imanishi-Kari, T. y Baltimore, D. (1983) *Cell* 33, 85-93.
- Lofdahl, S., Guss, B., Uhlem, B., Philipson, L. y Lindberg, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 697-701.
- Loos, M., Wellek, B., Thesen, R. y Opferkoch, W. (1978) *Infect. Immun.* 22, 5-9.
- Low, T.L.K., Liu, V.Y. y Putnam, F.W. (1976) *Science* 191, 390-391.
- Malamud, D. y Drysdale, J.W. (1978) *Anal. Biochem.* 86, 620-647.
- Mancini, G., Carbonara, O. y Hereman, S.J.F. (1965) *Immunochemistry* 2, 235-254.
- Marchalonis, J.J. (1969) *Biochem. J.* 113, 299-305.
- Marchalonis, J.J. (1982) *Immunol. Today* 3, 10-17.

- Mauch, H., Kumel, G. y Hammer, H. (1980) *Res. Exp. Med. (Berl)* 177, 33-41.
- Max, E.E., Seidman, S.G. y Leder, P. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3450-3454.
- Max, E.E., Maizel, Jr., J.V. y Leder, P. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5116-5120.
- Marquart, M. y Deisenhofer, J. (1982) *Immunol. Today* 3, 160-166.
- McCarty, M. (1980) en *Microbiology*, 3 edn. pp. 608-622, Harper y Row Publishers, Inc., Maryland, USA.
- McDowell, G., Grov. A. y Oeding, P. (1971) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. B* 79, 801-804.
- McKenzie, M.R., Gutman, G.A. y Warner, N.L. (1978a) *Scand. J. Immunol.* 7, 367-370.
- McKenzie, M.R., Warner, N.L. y Mitchell, G.F. (1978b) *J. Immunol.* 120, 1493-1496.
- McKenzie, I. y Potter, T. (1979) *Adv. Immunol.* 27, 179-338.
- Medgyesi, G.A., Fust, F., Gergohy, J. y Bazin, J. (1978) *Immunochimistry* 15, 125-129.
- Melchers, F., Andersson, J., Lernhardt, W. y Schereier, M.H. (1980) *Immunol. Rev.* 52, 89-114.
- Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R., Hodgson, J.C., Schlossman, S.F. y Reinherz, E.L. (1983a) *J. Exp. Med.* 157, 705-719.
- Meuer, S.C., Acuto, O., Hussey, R.E., Hodgson, J.C., Fitzgerald, K.A., Schlossman, S.F. y Reinherz, E.L. (1983b) *Nature* 303, 808-810.
- Michaelson, T.E. y Natvig, J.B. (1972) *Scand. J. Immunol.* 1, 255-268.
- Michaelson, T.E., Frangione, B. y Franklin, E.C. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 883-889.

- Miller, E.J. y Terry, W.D. (1968) *J. Immunol.* 101, 1300-1307.
- Miller, F. y Metzger, H. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3325-3333.
- Miller, F. y Metzger, H. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 1732-1740.
- Miorner, H., Myhre, E., Bjorck, L. y Kronvall, G. (1980) *Infect. Immun.* 29, 879-885.
- Miyata, T., Yasunaga, T., Yamawaki-Kataoka, Y., Obata, M. y Honjo, T. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2143-2147.
- Morrison, M. y Huttquist, D.E. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 2847-2853.
- Morse, S.I. (1980) en *Microbiology*, 3 edn. pp.624-634, Harper y Row Publishers, Inc., Maryland, USA.
- Mota, G., Moraru, I., Sjoquist, J. y Ghetie, V. (1981) *Mol. Immunol.* 18, 373-378.
- Movitz, J. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 131-136.
- Movitz, J. (1976) *Eur. J. Biochem.* 68, 291-299.
- Movitz, J., Masuda, S. y Sjoquist, J. (1979) *Microbiol. Immunol.* 23, 51-58.
- Muraguchi, A., Butler, J.L., Kerhl, J.H. y Fauci, A.S. (1983) *J. Exp. Med.* 157, 530-546.
- Musher, D.M., Verbrugh, H.A. y Verhoef, J. (1981) *J. Immunol.* 127, 84-88.
- Muller, H.-P., Schaeg, W. y Blobel, H. (1981) *Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A249*, 443-451.
- Myhre, E.B. y Kronvall, G. (1980a) *Infect. Immun.* 27, 6-14.
- Myhre, E.B. y Kronvall, G. (1980b) *Mol. Immunol.* 17, 1563-1573.
- Myhre, E.B. (1981) *Tesis*, Universidad de Lund, Suecia.
- Nakamishi, K., Sugimura, K., Yaoita, Y., Maeda, K., Kashiwamura, S., Honjo, T. y Kishimoto, T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6984-6988.

- Nakao, Y., Kishihara, M., Baba, Y., Fujita, T. y Fujiwara, K. (1980) *Cell. Immunol.* 50, 361-368.
- Natvig, J.B. y Turner, M.W. (1971) *Clin. Exp. Immunol.* 8, 685-691.
- Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N. y Woerney, D.L. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 89, 230-244.
- O'Keefe, E. y Bennett, V. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 561-568.
- Ollo, R., Sikorav, J.-L. y Rougeon, F. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11, 7887-7897.
- Ornstein, L. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321-403.
- Ouchterlony, O. (1958) en *Progress in Allergy*, vol. V (Kallos, P. ed.) pp. 1-78, Karger, Basilea, Suiza.
- Ouchterlony, O. y Nilsson, A. (1978) en *Handbook of Experimental Immunology*, 3 edn. (Weir, D.M.) pp. 19.1-19.44, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Reino Unido.
- Padlan, E.A., Segal, D.M., Spande, T.F., Davies, D.R., Rudikoff, S. y Potter, M. (1973) *Nature New Biol.* 245, 165-167.
- Padlan, E.A. (1979) *Mol. Immunol.* 16, 287-296.
- Parkhouse, R.M.E. (1975) *Immunology* 27, 1063-1071.
- Paterson, P.A., Rasek, L., Sege, K., Klareskog, L, Anundi, H. y Ostberg, L. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1612-1616.
- Patrick, C.C. y Virella, G. (1978) *Immunochemistry* 15, 137-139.
- Perry, R.P. (1981) *J. Cell. Biol.* 91, 28s-38s.
- Peterson, P.K., Verhoeff, J., Sabath, L.D. y Quie, P.G. (1977) *Infect. Immun.* 15, 760-764.
- Pharmacia Fine Chemicals (1979) *Affinity Chromatography. Principles and methods*. Uppsala, Suecia.
- Pink, J.R.L., Buttery, S.H., DeVries, G.M. y Milstein, C. (1970) *Biochem. J.* 117, 33-47.

- Plaut, A.G. y Tomassi, Jr., T.B (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65, 318-322.
- Plaut, A.G., Wistar, Jr., R. y Capra, J.D. (1974) *J. Clin. Invest.* 54, 1295-1300.
- Poljak, R.J., Amzel, L.M., Avery, H.P., Chen, B.L., Phizackerley, R.P. y Saul, F. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3305-3310.
- Poljak, R.J., Amzel, L.M. y Phizackerley, R.P. (1976) *Prog. Biophys, Molec. Biol.* 31, 67-93.
- Poljak, R.J., Nakashima, Y., Chen, B.L. y Konigsberg, W. (1977) *Biochemistry* 16, 3412-3420.
- Porter, R.R. (1959) *Biochem. J.* 73, 119-126.
- Putnam, F.W. (1977a) en *The Plasma Proteins*, 2 edn. vol. III (Putnam, F.W., ed.) pp. 1-153, Academic Press, New York, USA.
- Putnam, F.W. (1977b) en *The Plasma Proteins*, 2 edn., vol. III. (Putnam, F.W. ed.) pp. 224-284, Academic Press, New York, USA.
- Queen, C. y Baltimore, D. (1983) *Cell* 33, 741-748.
- Raschke, W.C., Mather, E.L. y Koshland, M.E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3469-3473.
- Ravetch, J.V., Kirsch, I.R. y Leder, P. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6734-6738.
- Ray, A. y Cebra, J.J. (1972) *Biochemistry* 11, 3647-3653.
- Ray, P.K., Raychaudhury, S. y Allen, P. (1982) *Cancer Res.* 42, 4970-4974.
- Ray, P.K. y Bandyopadhyai, S.K. (1982) *Fed. Proc.* 41, 556
- Ray, P.K. y Bandyopadhyai, S.K. (1983) *Immunol. Commun.* 5, 453-464.
- Rechavi, G., Bienz, B., Ram, D., Ben-Neriah, Y., Cohen, J.B., Zakut, R. y Givol, D. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4405-4409.

- Rechavi, G., Ram, D., Glazer, L., Zakut, R. y Givol, D.
(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 855-859.
- Recht, B., Frangione, B., Franklin, E.C. y VanLoghem, E.
(1981) *J. Immunol.* 127, 917-923.
- Reichert, C.M., Carelli, C., Jolivet, M., Audibert, F.,
LeFrancier, P. y Chadid, L. (1980) *Mol. Immunol.* 17, 3573-3634.
- Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H. y
Schlossman, S.F. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1588-1592.
- Reinherz, E.L., Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E.,
Hodgson, J.C., Acuto, O. y Schlossman, S.F. (1983) *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA* 80, 4104-4105.
- Reisner, A.H., Nemes, P. y Bucholtz, C. (1975) *Anal. Biochem.*
64, 509-516.
- Ricardo, Jr., M.J., Trouy, R.L. y Grimm, D.T. (1981)
J. Immunol. 127, 946-951.
- Richman, D.D., Cleveland, P.H., Oxman, M.N. y Johnson, K.M.
(1982) *J. Immunol.* 128, 2300-2305.
- Ringden, O. y Rynnel-Dagoo, B. (1978) *Eur. J. Immunol.* 8, 47-52.
- Rodwell, J.D., Gearhart, P.J. y Karush, F. (1983) *J. Immunol.*
130, 313-316.
- Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M.,
Hood, L. y Wall, R. (1980) *Cell*, 20, 303-312.
- Romagnani, S., Amador, A., Giudizi, M.G., Biagiotti, R.,
Maggi, E. y Ricci, M. (1978) *Immunology* 35, 471-479.
- Romagnani, S., Giudizi, M.G., Almerigogne, F. y Ricci, M.
(1980) *J. Immunol.* 124, 596-602.
- Romagnani, S., Giudizi, M.G., Almerigogna, F., Biagiotti, R.,
Bellesi, G., Bernard, F. y Ricci, M. (1981a) *Clin. Immunol.
Immunopathol.* 19, 139-146.
- Romagnani, S., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Almerigogne, F.,
Maggi, E., DelPrete, G. y Ricci, M. (1981b) *J. Immunol.* 127,
1307-1313.

- Romagnani, S., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Almerigogne, F., Del Prete, G., Maggi, E. y Ricci, M. (1982a) *Scand. J. Immunol.* 15, 287-295.
- Romagnani, S., Giudizi, M.G., DelPrete, G., Maggi, E., Biagiotti, R., Almerigogne, F. y Ricci, M. (1982b) *J. Immunol.* 129, 596-602.
- Rousseaux, J., Picque, M.T., Bazin, H. y Bizerte, G. (1981) *Mol. Immunol.* 18, 639-645.
- Rowe, D.J., Hug, K., Forni, L. y Pernis, B. (1973) *J. Exp. Med.* 138, 965-972.
- Sakane, T. y Green, I. (1978) *J. Immunol.* 120, 302-311.
- Sakano, H., Rogers, J.H., Huppi, K., Brack, C., Traunecker, A., Maki, R., Wall, R. y Tonegawa, S. (1980) *Nature* 277, 627-633.
- Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W. y Tonegawa, S. (1980) *Nature* 280, 676-683.
- Saltvedt, E. y Harboe, M. (1976) *Scand. J. Immunol.* 5, 1103-1108.
- Sarkart, M., Liao, J., Kabat, E.A., Tanabe, T. y Ashwell, G. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3170-3174.
- Saul, F., Amzel, L.M. y Poljak, R.J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 585-597.
- Scatchard, G. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
- Shiffer, M., Girling, R.L., Ely, K.R. y Edmunson, A.B. (1973) *Biochemistry* 12, 4620-4631.
- Shuurman, R.K.B., Gelfand, E.W. y Dosch, H.M. (1980) *J. Immunol.* 125, 820-826.
- Segal, D.M., Taurog, J.D. y Metzger, H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2993-2997.
- Siden, E.J., Baltimore, D., Clark, D. y Rosenberg, N.E. (1979) *Cell* 16, 389-396.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E. y Maizel, J.V. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820.

- Shimizu, A., Watanabe, S., Yamamura, Y. y Putnam, F.W.
(1974) *Immunochemistry* 11, 719-727.
- Shimizu, A., Takahashi, N., Yamawaki-Kataoka, Y., Nishida, Y.,
Kataoka, T. y Honjo, T. (1981) *Nature* 289, 49-53.
- Shimizu, A., Takahashi, N., Yaoita, Y. y Honjo, T. (1982)
Cell 28, 499-506.
- Siebelinst, U., Ravetch, J.V., Korsmeyer, S., Waldman, T.
y Leder, P. (1981) *Nature* 294, 631-635.
- Siegel, R.C. y Cathou, R.E. (1981) *Biochemistry* 20, 192-198.
- Siekewitz, M., Gefter, M.L., Brodeur, P., Riblet, R. y
Marshak-Rothstein, A. (1982) *Eur. J. Immunol.* 12, 1023-1032.
- Sjodahl, J. (1977a) *Eur. J. Biochem* 73, 343-351.
- Sjodahl, J. (1977b) *Eur. J. Biochem.* 78, 471-490.
- Sjodahl, J. y Moller, G. (1979) *Scand. J. Immunol.* 10, 593-599
- Sjoholm, I., Ekenas, A.-K. y Sjoquist, J. (1972) *Eur. J.
Biochem.* 29, 455-460.
- Sjoholm, I., Bjerken, A. y Sjoquist, J. (1973) *J. Immunol.*
110, 1562-1569.
- Sjoholm, I. y Sjodin, T. (1974) *Eur. J. Biochem.* 47, 491-498.
- Sjoholm, I. (1975) *Eur. J. Biochem.* 51, 55-61.
- Sjoquist, J., Meloun, B. y Hjelm, H. (1972a) *Eur. J. Biochem.*
29, 572-578.
- Sjoquist, J., Movitz, J., Johansson, J.-B. y Hjelm, H. (1972b)
Eur. J. Biochem. 30, 190-194.
- Skvaril, F. (1976) *Immunochemistry* 13, 871-872.
- Sloan, G.L., Smith, E.C. y Lancaster, J.H. (1977) *Biochem. J.*
167, 293-296.
- Smith, E.M., Johnsson, H.M. y Blalock, J.E. (1983) *J. Immunol.*
130, 373-376.

- Smith, H. (1977) *Bacteriol. Rev.* 41, 475-500.
- Stalenheim, G. y Castensson, S. (1971) *FEBS Lett.* 14, 79-81.
- Stalenheim, G. y Malmheden-Eriksson, I. (1971) *FEBS Lett.* 14, 82-85.
- Stanilawski, M. y Mitard, M. (1979) *J. Immunol.* 122, 1045-1053.
- Studier, F.W. (1973) *J. Mol. Biol.* 79, 237-248.
- Sumiya, M., Kano, S., Oshimi, K., Gonda, N. y Takaku, F. (1980) *Int. Arch. Allergy appl. Immun.* 61, 394-406.
- Takahashi, N., Tetaert, D., Debuiere, B., Lin, L.C. y Putnam, F.W. (1982a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2850-2854.
- Takahashi, N., Vech, S., Obata, M., Nikaido, T., Nakai, S. y Honjo, T. (1982b) *Cell* 29, 671-679.
- Takahashi, Y., Takahashi, N., Tetaert, D. y Putnam, F.W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3686-3690.
- Tengblad, A. (1980) *Biochem. J.* 185, 101-105.
- Terman, D.S., Yamamoto, R., Tillgnist, R.L., Henry, J.F., Cook, G.L., Silvers, S.A. y Shearer, W.T. (1980) *Science* 109, 1257-1259.
- Tonegawa, S., Maxam, A.M., Tizard, R., Bernard, O. y Gilbert, W. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1485-1489.
- Tonegawa, S. (1983) *Nature* 302, 575-581.
- Toraño, A., Tsuzukida, Y., Liu, Y.-S.V. y Putnam, F.W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2301-2305.
- Toraño, A. y Putnam, F.W. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 966-969.
- Turner, M.W., Bennich, H. y Natvig, J.B. (1970) *Clin. Exp. Immunol.* 7, 603-609.
- Tyler, B.M., Cowman, A.F., Gerondekis, S.D., Adams, J.M. y Bernard, O. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2008-2012.

- Umeda, A., Ikabuchi, T. y Amako, K. (1980) *J. Bacteriol.* 141, 838-844.
- Van Loghem, E., Frangione, B., Recht, T. y Franklin, E.C. (1982) *Scand. J. Immunol.* 15, 275-278.
- Van Kamp, G.J. (1979) *J. Immunol. Meth.* 27, 301-305.
- Vesella, R.L., Gormus, B.J., Lange, P.H. y Kaplan, M.E. (1978) *Int. J. Cancer* 21, 594-603.
- Vesterberg, O. y Svensson, H. (1966) *Acta Chem. Scand.* 20, 820-834.
- Virella, G. y Parkhouse, M.E. (1971) *Immunochemistry* 8, 243-249.
- Virella, G., Koistinen, J., Cardenas, R., Patrick, C.C., Higerd, T.B., Fett, J.V. y Fudenberg, H.H. (1978) *Immunochemistry* 15, 165-170.
- Wall, R.R. y Kuehl, M. (1983) *Ann. Rev. Immunol.* 1, 393-422.
- Waller, M., Richard, A.J. y Mallorg, J. (1969) *Immunochemistry*, 6, 207-215.
- Wang, A.C. (1978) en *Comprehensive Immunology. V. Immunoglobulins.* (Litman, G.W. y Good, R., ed.) pp. 229-255, Plenum Press, New York, USA.
- Weber, K. y Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- Wichman, A. y Borg, H. (1977) *Biochem. Biophys. Acta* 490, 363-369.
- Wideback, K., Seal, U.S. y Kronvall, G. (1982) *Infect. Immun.* 36, 469-475.
- Wilson, I.D. y Williams, Jr., R.C. (1969) *J. Clin. Invest.* 48, 3409-3415.
- Winblad, S. y Ericsson, C. (1973) *Acta path. microbiol. Scand. Sect. B.* 81, 150-156.

- Winchester, R.J., Fu, S.M., Hoffman, T. y Kunkel, H.G.
(1975) *J. Immunol.* 11, 1210-1215.
- Winkelhake, J.L. (1978) *Immunochemistry* 15, 695-714.
- Wolfenstein-Todel, C., Frangiones, B., Prehl, F. y
Franklin, E.C. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71,
907-914.
- Wood, C. y Tonegawa, S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
80, 3030-3034.
- Wrigley, N.G., Brown, E.B. y Skehel, J.J. (1983) *J. Mol.*
Biol. 169, 771-774.
- Wu, T.T. y Kabat, E.A. (1970) *J. Exp. Med.* 132, 211-250.
- Yamawaki-Kataoka, Y., Nakai, S., Miyata, T. y Honjo, T.
(1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2623-2627.
- Zikan, J. (1980a) *Folia Microbiol.* 25, 246-253.
- Zikan, J. (1980b) *Folia Microbiol.* 25, 254-258.
- Zikan, J., Sime, P., Prokesova, L. y Hodge, D. (1980)
Folia Biol. 26, 261-266.